

PTPIP51 und seine Interaktionspartner in der humanen Plazenta unterschiedlicher Gestationsstadien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jens Hoffmann
aus Siegen

Gießen 2009

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leitung: Prof. Dr. med. W. Kummer

1. Gutachter: Frau PD Dr. M. Wimmer-Röll

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 09.03.2010

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen,

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Protein-Tyrosin-Phosphatasen	2
1.3	Phospho-Tyrosin-interagierendes Protein 51 (PTPIP51)	4
1.4	In vitro Interaktionspartner der PTPIP51	6
1.4.1	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B)	6
1.4.2	14-3-3 β	8
1.4.3	c-Src-Kinase	9
1.4.4	Raf-1	10
1.5	Entwicklung der Plazenta	10
1.5.1	Frühe Entwicklung und Implantation	11
1.5.2	Verschiedene Zottentypen der Plazenta	12
1.5.3	Entwicklung der Zotten	13
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Verwendete Pufferlösungen	16
2.1.4	Eindeckmedium	17
2.1.5	Probenmaterial	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Entnahme der Proben	17
2.2.2	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	18
2.2.2.1	RNA-Isolation	18
2.2.2.2	cDNA-Synthese	18
2.2.2.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	18
2.2.3	Western Blot	19

2.2.4	Histologie	20
2.2.4.1	Kyrostatschnitttherstellung	20
2.2.4.2	Immunhistochemie	20
2.2.4.3	Liste der verwendeten Antikörper	24
2.2.4.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
2.2.4.5	Tunnel Assay	25
2.2.4.6	Fluoreszenzmikroskopie	26
2.2.4.7	Dokumentation	27
2.2.5	In situ Hybridisierung	27
3	Ergebnisse	30
3.1	RT-PCR und Immunoblotting	30
3.2	In situ Hybridisierung	31
3.3	PTPIP51 in der humanen Plazenta	32
3.4	PTP1B in der humanen Plazenta	34
3.5	PTPIP51 in Gefäßen	35
3.6	Apoptose	37
3.7	In vitro Interaktionspartner	39
3.7.1	14-3-3β	40
3.7.2	c-Src	42
3.7.3	Raf-1	44
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	54
6	Summary	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Anhang	70

8.1	Abkürzungsverzeichnis	70
8.2	Publikation	73
8.3	Danksagung	73
8.4	Lebenslauf	74

1. Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Jeder Organismus ist in der Lage auf äußere oder physiologische Reize und Veränderungen zu reagieren. Diese Reaktion ist immer die Folge einer Signalübertragungskaskade in der jeweiligen Zelle. Als mögliche Mediatoren/Initiatoren seien hier beispielhaft nur Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren genannt. Diese Mediatoren binden an spezifische Rezeptoren und bewirken durch eine Signaltransduktionskaskade die Weitergabe von Informationen an den Zellkern. Nicht selten läuft diese Form der Aktivierung über eine Phosphorylierung oder durch den Austausch von gebundenen GDP durch GTP ab.

Auf zellulärer Ebene bedarf es einer ständigen Regulation dieser chemischen Signale. Werden an den Kaskaden beteiligte Proteine oder andere intrazellulär lokalisierte Proteine moduliert, kann dies sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Deaktivierung bzw. zu einer Steigerung oder Hemmung der Signalübertragung führen. Dies hat einen erheblichen Einfluss auf die Enzym-/Genaktivität der jeweiligen Zelle.

Durch die gegensätzliche Wirkung von Protein-Phosphatasen und Protein-Kinasen wird die reversible Protein-Phosphorylierung reguliert und ist unter anderem von großer Bedeutung beim Durchlaufen des Zellzyklus, der Proliferation, der Differenzierung, der zytoskelettalen Organisation und der Apoptose. Ausserdem wird über den Phosphorylierungsgrad die Stoffwechselleistung, die neuronale Entwicklung, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die Transkription und die Immunantwort reguliert.

Da der Phosphorylierungsgrad der Proteine für jede Zelle von existenzieller Wichtigkeit ist, bedarf dieser einer exakten Kontrolle. Die Menge der in phosphorylierter Form vorliegenden Proteine wird durch die genau aufeinander abgestimmte Aktivität von Phosphatasen und Kinasen reguliert. Bei einer Störung in diesem ausgeglichenen System *in vivo*, kann es zur Entstehung von malignen Tumoren und immunologischen Defekten kommen.

Schätzungen zufolge liegen etwa ein Drittel aller intrazellulären Proteine in eukaryotischen Zellen in phosphorylierter Form vor (Cohen 2000). Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste in der Proteinstruktur sind Voraussetzung für eine Phosphorylierung. Die meisten Proteine sind an Serin- oder Threonin-Resten und nur 0,01-0,05% an Tyrosin-Resten phosphoryliert (Hunter und Sefton 1980; Hunter 1995). Bei den an Serin- und Threonin-Resten aktivierten Enzymen liegt beinahe ein Gleichgewicht zwischen der Aktivität der Kinasen zu den Phosphatasen vor. Im Gegensatz dazu existiert bei den an Tyrosin-Resten phosphorylierten Proteinen ein deutliches Übergewicht der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) im Vergleich zu Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Die erwartete Aktivität der PTPasen ist um 3-4 Potenzen höher, als die der PT-Kinasen (Mustelin et al. 1989). Die Ursache für dieses Missverhältnis ist darin zu suchen, dass PTPasen nicht nur substratspezifisch Phosphat von PTKs, sondern auch von Proteinkinasen selbst, sowie anderen phosphorylierten Proteinen dephosphorylieren und so deren Aktivitätsniveau kontrollieren können (Qu 2002).

1.2 Protein-Tyrosin-Phosphatasen

PTPs sind Enzyme, deren Wirkung denen der PTKs entgegengesetzt ist und sind somit ebenfalls elementare Bestandteile vieler Signaltransduktionswege. Sie dienen als Katalysator und ermöglichen die Reaktion vom Tyrosinphosphat und H_2O zu Proteintyrosin und Orthophosphat. Die reversible Dephosphorylierung von Tyrosin-Resten kann sich sowohl inhibierend als auch aktivierend innerhalb der zellulären Signaltransduktionskaskade auswirken.

Das menschliche Genom umfasst 107 Gene, die für PTPs kodieren (Alonso et al. 2004).

Untergruppen der PTP-Familie:

- ♦ „klassische“ PTPs mit einer Spezifität ausschließlich für Tyrosinphosphate (Jia et al. 1995)

- ♦ „dual-spezifische“ Phosphatasen (DSPs), welche die Eigenschaft aufweisen auch Serin- und Threoninphosphate zu dephosphorylieren (Yuvaniyama et al. 1996, Dewang et al. 2005)
- ♦ „low-molecular-weight“ PTPs, die aktiviertes PDGF-R, p190RhoGAP und die GTPase Rho dephosphorylieren und damit an der durch PDGF-R vermittelten Zellteilung und an der Reorganisation des Zellskelettes beteiligt sind (Raugei et al. 2002).

Das Ergebnis der chemischen Reaktion ist bei allen drei Klassen die Hydrolyse von Phosphat-Monoestern, doch der Reaktionsablauf ist sehr unterschiedlich. Alle PTPs weisen eine homologe, ca. 240 Aminosäuren lange, konservierte katalytische Domäne auf. Diese liegt in einer unabhängig gefalteten Domäne des Proteins. Die Sequenz der konservierten Domäne ist (V/H)C(X)₅R(S/T), wobei X eine willkürliche Aminosäure darstellt (Neel et al. 1997). Außerdem besitzen PTPs einen so genannten Loop, bei dem es sich um eine konservierte Phosphat-bindende-Schleife handelt, der einen essentiellen Aspartat-Rest beinhaltet (Barford 1999). Die Aminosäuresequenzen an dem N- und C-Terminus liegen außerhalb des katalytischen Zentrums, sind hoch variabel und entscheidend für die Spezifität.

Die „klassischen“ PTPs werden weiter in transmembranäre (Rezeptor-PTPs) und cytoplasmatische (non-Rezeptor-PTPs) PTPs eingeteilt. Sie gehören der Gruppe der Nicht-Metalloenzyme an, die durch kovalente Bindung zunächst ein Phospho-Cystein-Intermediat bilden, welches in einem zweiten Reaktionsschritt zu den Endprodukten führt (Guan et al. 1991).

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen sind Defekte der PTPs nachweisbar. Hierzu zählen unter anderem Immundefekte, Diabetes mellitus, verschiedene Formen von Krebs oder infektiologische Erkrankungen (van Huijsduijnen et al. 2004, Freiss et al. 2004, Wang et al. 2004, Ouellet et al. 2003). Ferner konnte Freiss und Kollegen (2004) den Nachweis erbringen, dass bei Krebserkrankungen ein Missverhältnis zwischen dephosphorylierenden Phosphatasen und phosphorylierenden Kinasen besteht.

1.3 Phospho-Tyrosin-interagierendes Protein 51 (PTPIP51)

Das Protein-Tyrosin-Phosphatase-Interagierende-Protein 51 (PTPIP51; SwissPort Accession code Q96SD6;EMBL accession No. AK 001441 (Ota et al. 2004)) ist bei einem Interaktions Screen mit der TC-PTP/PTP1B mittels „Yeast-Two-Hybrid-Methode“ entdeckt worden (Porsche 2001). Das Gen der humanen *PTPIP51* ist auf dem Chromosom 15 (15q15.1) lokalisiert und kodiert insgesamt für 12 Exone. Die Exone 1 bis 4 weisen auf DNA-Ebene das für Initiationskomplexe typische AUG-Triplett auf, wobei die Exone 1 bis 3 AUG-Triplets keine Kozak-Sequenz aufweisen, das Exon 4 hingegen eine solche zeigt. Das Protein hat eine Nukleotidlänge von 2251 Basenpaaren, was einer Sequenz von 470 Aminosäuren entspricht (Ota et al. 2004). Die Expression des Proteins erfolgt in unterschiedlichen Isoformen. Eine Berechnung der theoretischen Molekulargewichte der jeweiligen Isoformen führte zu Molekulargewichten von 30, 38, 45 und 52kDa (Pfeiffer 2006). Das errechnete Molekulargewicht beträgt 52.118 Dalton. Es existiert eine large PTPIP51-Form mit einem Molekulargewicht von 52,1 kDa, was dem berechneten Molekulargewicht am ehesten entspricht. Als weiteres gibt es noch eine „middle“ PTPIP51 mit einem Molekulargewicht von 45- und eine kleine membrangebundene Form („small“ PTPIP 51) von 30 kDa.

Die Sekundärstruktur des Proteins besteht mit einer Wahrscheinlichkeit von 12,1% aus β -Faltblatt, mit 30,5% aus Loops und mit 57,4% aus Helices (Welte 2000). Eine Identifizierung von Transmembrandomänen mittels Hydrophobitätsanalysen war nicht möglich (Welte 2000).

Eine Motivsuche zur biochemischen Charakterisierung in einer Datenbank (PROSCAN in ExPASy.ch) führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Verschiedene hypothetische Phosphorylierungsstellen für:

- cAMP- und cGMP- abhängige Protein-Kinase (AS 186-189)
- Protein-Kinase C (AS 51-53, 91-93, 166-168, 181-183, 272-274, 324-326)
- Casein-Kinase II (AS 143-146, 145-148, 160-163, 166-169, 202-205, 210-213, 249-252, 324-327, 357-360, 375-378, 428-431)

3. Zell-Attachement-Stelle: AS 227-229 (RGD)

4. „Ran-GTPase-activating-protein“-Motiv: für das die basischen Aminosäuren

Arginin und Lysin verantwortlich sind. Mit einer 87%tigen Sicherheit befindet sich so

ein derartiges Motiv zwischen den AS 1-386. Zwischen den AS 115-119 befindet sich eine Folge von 5 Arginin-Resten innerhalb der AP51-Sequenz.

Da die Tertiärstruktur von PTPIP51 noch nicht geklärt ist, ist noch unklar mit welcher Wahrscheinlichkeit diese Motive innerhalb der Proteinstruktur vorliegen (Welte 2000, Brüklen 2001).

Bei PTPIP51 handelt es sich um ein evolutionär konserviertes Protein, welches in Geweben und Organen verschiedener Säugetierspezies wie Schweinen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Menschen vorkommt (Stenzinger et al. 2005). Zusätzlich wird es in Karzinomen (Lv et al. 2006, Koch et al. 2007), als auch in unterschiedlichen Zelllinien einschließlich der BeWo-Zelllinie (humane Choriokarzinomzellen) (Stenzinger et al. 2005) exprimiert. Dabei fand sich PTPIP 51 in Geweben, die einer präzisen Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose unterworfen sind (Nickoloff und Denning 2001), wie in Keimepithelien und der Epidermis (Stenzinger et al. 2005, 2006,). Ebenso zeigten Stenzinger und Kollegen (2007) an humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen), dass durch den Einfluss von Vitamin D₃ (1,25 (OH)₂D₃), das zu einer Differenzierung der Zellen führt, es zu einer gesteigerten PTPIP51 Expression kommt. Eine Zunahme der Proteinexpression konnte auch über sehr hohe Konzentrationen von Retinolsäure, welche zum Differenzierungsstopp und zur Induktion der Apoptose führt, erreicht werden. Eine Abnahme von PTPIP51 in den Zellen wurde durch eine niedrige Konzentration von EGF, was einen Proliferationsstimulus darstellt, bewirkt. Darüber hinaus beschrieben Märker und Kollegen (2008) den entscheidenden Einfluss von PTPIP51 in der Entwicklung des Auges bei der Maus. In Übereinstimmung mit diesen Daten haben Roger et al. (2007) aufgezeigt, dass CNTF (ciliary neurotropic factor), ein neuropoetisches Zytokin, Mitglied der Interleukin-6 Familie, das die über Tyrosin-Phosphorylierung regulierte JAK-STAT Signalkaskade stimuliert, die PTPIP51 Transkription in Retina Explantaten von Ratten reguliert. Sie wiesen ein biphasisches Expressionsmuster von PTPIP51 während der postnatalen Retinaentwicklung nach.

Eine Expression des Proteins während der Mausentwicklung wurde auch im Plexus choroideus, in der Zunge, in den Muskeln und in der Lunge nachgewiesen (Märker, unveröffentlichte Ergebnisse). Interessanterweise beschrieb Lv et al. (2006) für die

„full length form“ PTPIP51 eine mitochondriale Zielsequenz. Diese Form führt bei Überexpression in HEK293T Zellen zur Apoptose. Weitere Untersuchungen bestätigen die Funktion der PTPs als Signalpartner im Apoptosesignalweg (Stenzinger et al. 2006).

Sie zeigten ebenfalls den Einfluss von PTPIP51 auf die Zelldifferenzierung. Wie in der Epidermis, setzt die Entwicklung und funktionelle Integrität der Synzytiotrophoblasten, die sich aus Zytotrophoblasten entwickeln, eine fein justierte Wechselwirkung zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose voraus (Huppertz et al. 2006, Kar et al. 2007). Die Regulation all dieser Prozesse ist von einer Vielzahl von Signal-Kaskaden, einschließlich der Tyrosine-Phosphorylierung, abhängig. Störungen in diesem empfindlichen Gleichgewicht können zu trophoblastischen Schwangerschaftserkrankungen, wie etwa zur Blasenmole (*Mola hydatidosa*) oder Chorionkarzinom führen (Li et al. 2002, Shih 2007).

1.4 In vitro Interaktionspartner der PTPIP 51

1.4.1 Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B)

Die PTP1B gehört zur PTP-Superfamilie, welche eine hohe Diversität aufweist. Die genetische Information der verschiedenen humanen PTPs ist auf 107 Genen lokalisiert und deren Genprodukte die phosphorylierungsabhängigen Signalwege streng kontrollieren (Alonso et al. 2004). Die weit verbreitete PTP1B gehört zu den am besten erforschten PTP der PTP-Superfamilie. Sie ist in eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionswegen verstrickt, wodurch sie auf zellulärer Ebene Einfluss auf metabolische, onkogene und zytokinvermittelte Signaltransduktionswege nehmen kann (Tonks 2003). Ursprünglich aus der humanen Plazenta isoliert (Charbonneau et al. 1989), hat sie großen Einfluss auf die Regulation des Immunsystems, den Insulin-Signal-Weg, Stoffwechselerkrankungen und diverse Krebserkrankungen (Tonks 2003, Dubé und Tremblay 2005, Ostman et al. 2006).

Die full length Form der PTP1B ist vornehmlich über ihren hydrophilen C-Terminus am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert (Frangioni et al. 1993). Weitere zellspezifische Formen mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation werden

entweder durch insulin- (Shifrin und Neel 1993) und wachstumsfaktoren- (Sell und Reese 1999) induzierte mRNA-Splicing-Varianten oder über Calpain vermittelte proteolytische Spaltungen gebildet (Akasaki et al. 2006, Gulati et al. 2004). Aus einer PTP1B Überexpression resultiert immer ein geringerer Phosphorylierungsgrad vieler Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, was wiederum das zelluläre Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der einzelnen Zelle beeinflusst. So ist die PTP1B zum Beispiel in der Lage die Insulinsignalkaskade zu antagonisieren (Tonks et al. 1990) bzw. Klamann und Kollegen (2000) zeigten, dass PTP1B-knock-out-Mäuse sensibler gegenüber Insulin sind. In der Onkogenese ist die PTP1B einbezogen bei der Regulation der Zelladhäsion und -migration durch eine Abwärtsregulation der Signalfunktion in der Integrinkaskade (Liu et al. 1998). Dies geschieht über eine Dephosphorylierung von inhibitorischen Tyrosinresten der c-Src-Kinase. Darüber hinaus fördert PTP1B adhäsive Eigenschaften des Cadherin-Catenin-Complexes. Die Dephosphorylierung von β -Catenin führt zur Bildung eines N-Cadherin- β -Catenin-Komplexes, welcher große Bedeutung für die Gewebeintegrität besitzt (Xu et al. 2002). Fehlende PTP1B-Aktivität führt zu einem Zerfall des Komplexes, was wiederum die Motilität der Zellen und die Möglichkeit der Tumordinvasion und Metastasierung fördert (Ostman et al. 2006). Eine PTP1B Überexpression findet sich etwa in frühen Abschnitten von Mammakarzinomen (Mamma-Ca) (Wiener et al. 1994). Zudem ist es immer wahrscheinlicher, dass die PTP1B am Signalweg der Apoptose mitwirkt, so ist sie zum Beispiel an der Apoptose von humanen Gliom-Zellen beteiligt (Akasaki et al. 2006). Durch die Züchtung von Knock-out-Mäusen bestätigte sich die Annahme einer grundlegenden Rolle der PTP1B für die Immunzellkommunikation und ihrer funktionellen Mitwirkung bei Entzündungen, der Hämatopoiese und Lymphopoese. Bei Mäusen kontrolliert PTP1B die Myelopoese und die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen über eine negative Regulierung der Phosphorylierung von CSF-1R (colony-stimulating factor-1 receptor) (Heinonen et al. 2006).

1.4.2 14-3-3ß

Die 14-3-3 Signalmoleküle bilden eine Familie eukaryotischer evolutionär konservierter Proteine. Sie nehmen als Bindungsmoleküle „Chaperone“ Einfluss auf die Aktivität vieler Enzyme, kontrollieren deren subzelluläre Lokalisation und Funktion. Sie können den Zellzyklus, die Apoptose, die Transkription von Genen, den Transport von Proteinen innerhalb der Zelle und den Metabolismus beeinflussen (Ford et al. 1994, Masters und Fu 2001, van Hemert et al. 2001). Angehörige dieser Proteinklasse sind in allen eukaryotischen Zelltypen und in allen bis jetzt untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden worden (Fu et al., 2000). Bis zum heutigen Tage sind über 150 verschiedene Isoformen in 48 Spezies nachgewiesen. Dabei finden sich allein sieben Isoformen (β , γ , ϵ , ζ , δ , τ und η) bei Säugetieren (Rosenquist et al. 2000). Proteine der 14-3-3 Familie binden spezifisch an Phospho-Serin-Motiven, die sich an vielen Proteinen finden (Aitken et al. 2002). Obwohl manche Interaktionen unabhängig von einer Phosphorylierung stattfinden, so ist das „target binding“ durch die 14-3-3 hauptsächlich über Kinasen, welche phosphoserinhaltige Bindungsstellen schaffen, reguliert. Hierzu zählen die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC) und ebenso wichtig sind aber auch die Phosphatasen (Aitken et al. 2002, Dougherty and Morrison 2004). Die Hypothese besagt, dass 14-3-3 Proteine an ihren Interaktionspartnern eine Konformationsänderung auslösen, was wiederum eine Präsentation bzw. ein Verbergen von funktionellen Motiven nach sich zieht und damit letztlich zu einer Aktivitätsänderung der 14-3-3 Partnerproteine führt (Yaffe 2002). Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Interaktion zwischen der Raf-1/C-Raf Kinase und der 14-3-3 im Zytoplasma. Hier erleichtern sie die Raf-1 Aktivierung durch Ras und anderer Proteine, wodurch auch eine Modulierung der MAPK-Kaskade erfolgt (Fu et al. 2000, Xing et al. 2000). Zur Regulierung zellulärer Prozesse ist nicht nur der Aktivierungszustand eines Enzyms entscheidend, sondern auch dessen intrazelluläre Lokalisierung. Wie bereits in dem Review von Muslin und Xing (2000) beschrieben wurde, führt die Bindung an das 14-3-3 Protein häufig zu einer Änderung der subzellulären Lokalisation und beeinflusst so die funktionellen Eigenschaften des jeweiligen Proteins. So zum Beispiel hält eine 14-3-3 Bindung BAD (Bcl2-antagonist of cell death) im Zytoplasma und verhindert so eine Interaktion mit dem

antiapoptotischen Protein Bcl-2 und Bcl-X_L, welches sich in den Mitochondrien befindet (Datta et al. 2000, Zha et al. 1996). 14-3-3 vermittelt die Translokation einiger Proteine in den Zellkern (Brunet et al. 2002) und ist auch in den Proteintransport zwischen ER und der Plasmamembran involviert (Nufer und Hauri 2003).

1.4.3 c-Src-Kinase

Die Src-Familie umfasst neun Mitglieder, von denen einige ein beschränktes (Lyn, Lck, Hck, Blk, Fgr und Yrk) und andere ein ubiquitäres Expressionsmuster zeigen (Src, Fyn und Yes) (Brown und Cooper, 1996). Die stärkste Expression von Src-Kinasen findet man in Nervensystem, Blutplättchen und in geringerem Ausmaß während der Differenzierung des Myeloids (Barnekow und Gessler 1986, Gee et al. 1986). Die zellulären Hauptfunktionen der c-Src umfassen die Regulation des Wachstums, der Motilität der Zellen, die Hemmung von Apoptose und Angiogenese. Alles dies spielt eine Rolle im Entwicklungsprozess und der Homöostase (Brown und Cooper 1996). Zudem gibt es Hinweise, dass Src-Kinasen nicht nur zum Ausbruch einer Erkrankung beitragen, sondern auch an der Progression und der Metastasierung von vielen Tumoren beteiligt sind (Summy und Gallik 2003). Eine Beteiligung der Src bei der Tumorgenese konnte schon für viele maligne Tumoren nachgewiesen werden, dazu zählen unter anderen Mamma-Ca (Muthuswamy und Muller 1994, Verbeek et al. 1996), Ovarial-Ca (Wiener et al. 1999), Lungen-Ca (Mazurenko et al. 1992) und Pankreas-Ca (Lutz et al. 1998). Offensichtlich trägt eine verstärkte Genexpression und Proteinaktivität zur Entstehung von Krebs bei und nicht per se Mutationen in Src-Genen. Es liegen jedoch Hinweise vor, dass in einem Teil der Kolonkarzinome aktivierende Mutationen vorliegen, die zu einem transformierten Genprodukt führen (Irby et al. 1999).

Außer durch Autophosphorylierung (Superti-Fruga 1995), regulieren Kinasen, wie die Csk und Chk (Nada et al. 1993) und Phosphatasen, einschließlich der PTP1B (Bjorge et al. 2000), die Aktivität der Src genauestens über den Phosphotyrosinrest-527. Die Dephosphorylierung der Src durch die PTP1B bewirkt eine Aktivierung und die Phosphorylierung durch Csk inaktiviert diese. Die Mitglieder der Src-Familie

interagieren mit einer Vielzahl von Rezeptorsignalwegen inklusive des Integrinrezeptors, der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und dem IL-6-Rezeptor (Thomas und Brugge 1997).

1.4.4 Raf-1

Bei den Raf-Proteinen handelt es sich um eine Familie von Proteinkinasen, welche die Isoformen A-Raf, B-Raf und C-Raf/Raf-1 umfasst und zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen zählt. Die Raf-Kinasen der Säugetiere haben eine zentrale Aufgabe in der mitogen aktivierten Protein-Kinase-Kaskade (Ras/Raf/MEK/ERK). Diese steuert diverse Zellfunktionen, einschließlich der Transkription von Genen, der Apoptose und den Zellzyklus (McCubrey et al. 2007). Eine exakte Einstellung der Aktivität erfolgt unter anderem über das 14-3-3 (Fantl et al. 1994) an den vielen regulatorischen Phosphorylierungsstellen der Raf-1 (Chong et al. 2003, Steelman et al. 2004). Die Raf-1 wird ubiquitär in fast allen embryonalen und adulten Geweben exprimiert (Storm et al. 1990). So kann die Raf-1 in direkte Interaktion mit Akt-1 (apoptosis signal regulated kinase-1) und MST-2 (mammalian sterile 20-like kinase) treten, um so die Einleitung der Apoptose zu verhindern. In Fibroblasten und Keratinozyten, in denen das Raf-1 Gen ausgeschaltet ist, kommt es zur Bildung eines fehlerhaften Zytoskeletts und zu einer Störung der Zellmigration (Ehrenreiter et al. 2005).

1.5 Entwicklung der Plazenta

Die humane Plazenta ist ein Übergangsorgan und vermittelt physiologische Austauschvorgänge zwischen Mutter und Fötus. Sie besteht aus einem mütterlichen und einem fetalen Anteil. In ihr verlaufen mütterlicher und fetaler Kreislauf unmittelbar nebeneinander, dennoch sind sie durch Gewebsschichten, die Plazentaschranke, voneinander getrennt. Dem Fötus dient sie als Lunge, Niere und Darm. Zudem übernimmt die Plazenta auch eine wichtige Rolle als endokrine Drüse, welche Einfluss auf Ovar, Hypophyse und Hypothalamus nimmt.

Die Plazenta stellt ein funktionell autonomes Organ dar und übernimmt in der Schwangerschaft wichtige regulatorische Funktionen.

Grundlegende Strukturen der Plazenta sind die Kotyledonen, die Basalplatte, die Zotten, die Chorionplatte, das Amnion und die Nabelschnur. Die Plazenta besteht aus einem maternalen und einem fetalen Anteil. Der fetale Teil wird durch die Chorionplatte, Zytotrophoblastenschale und den intervillösen Raum gebildet. Die Chorionplatte setzt sich ihrerseits aus Amnion, dem extraembryonalen Mesenchym, den Zytotrophoblasten und den Synzytiotrophoblasten zusammen. Die Basalplatte als maternaler Teil setzt sich aus Dezidua basalis und embryonalen Gewebe (Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten) zusammen.

1.5.1 Frühe Entwicklung und Implantation

Die Zygote bildet sich durch die Fusion der Oozyte mit dem Spermium und ist Voraussetzung einer jeden Schwangerschaft. In den nächsten vier Tagen entwickelt sich die Zygote zu Blastomeren, auch Morulastadium genannt. In diesem Stadium vollzieht sich die Aufteilung der Blastomere in Embryoblasten und Trophoblasten. Die Morulazellen sind der Ursprung für den Embryo und auch der Plazenta einschließlich ihrer Anhangsstrukturen. Am 4. Entwicklungstag bildet sich die Blastozyste, eine mit Flüssigkeit gefüllte Höhle in der Morula. Dabei entwickeln die Zellen eine Polarität. Die äußeren Zellen bilden den Ausgang für die Membranen der Plazenta (Trophoblasten). Die inneren Zellen bilden den Embryoblasten. Etwa am 6. Tag post conceptionem findet die Implantation der Oozyte im Uterus statt.

Im Folgenden wird nur noch auf die weitere Entwicklung und Differenzierung der plazentaren Strukturen eingegangen, welche im Zusammenhang mit dieser Arbeit von Relevanz sind.

Mit fortschreitender Implantation erfährt der Trophoblast eine Differenzierung in Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Der einkernige Zytotrophoblast liegt unmittelbar unter der Synzytiotrophoblastenschicht und ist unregelmäßig verteilt. Die Zytotrophoblasten oder auch Langhans-Zellen genannt, sind eine Gruppe mitotisch sehr aktiver Zellen. Sie bilden eine geschlossene Schicht um den Keim. Da der Synzytiotrophoblast selber nicht regenerationsfähig ist, bilden sich ständig unter

Verlust der Zellgrenzen aus Zytotrophoblasten neue Synzytiotrophoblasten aus. Somit vollzieht sich eine fortlaufende Regeneration der Synzytiotrophoblasten aus Zellen der Zytotrophoblasten. Ab dem 4. Schwangerschaftsmonat verschwindet dieser zunehmend, was zu einer Reduktion der Diffusionsstrecke zwischen mütterlichen und fetalen Blutkompartiment führt. Die Synzytiotrophoblasten bilden eine mehrkernige Schicht und entstehen durch Fusion von Zytotrophoblasten. Sie wachsen infiltrativ mit Hilfe lytischer Enzyme in die Uterusschleimhaut ein und schaffen durch Apoptose Lücken, durch die die Blastozyste weiter in das Endometrium eindringt. Die Synzytiotrophoblasten sind Bestandteil der Plazentaschranke und phagozytieren die apoptotischen Dezidualzellen der Uterusschleimhaut. Eine weitere Aufgabe der Synzytiotrophoblasten während der ersten sieben bis neun Schwangerschaftswochen besteht in der Sezernierung von hCG (humanes Choriongonadotropin), welches eine Stimulation der Progesteronproduktion im Corpus luteum bewirkt. Im späteren Schwangerschaftsverlauf wird die Progesteronproduktion von der Plazenta übernommen. In der Synzytiotrophoblastenschicht bilden sich zunehmend, mit Gewebeflüssigkeit oder Uterussekret gefüllte, extrazytoplasmatische Vakuolen. Diese Trophoblastenlakunen anastomisieren Aufgrund der weiteren lytischen Aktivität der Synzytiotrophoblasten mit erodierten mütterlichen Kapillaren und Venolen im Endometrium. So füllen sich die Sinusoide mit maternalem Blut. Gegen Ende der Schwangerschaft bilden diese Lakunen ein zusammenhängendes System, das durch den Synzytiotrophoblasten begrenzt wird (intervillöser Raum).

1.5.2 Verschiedene Zottentypen der Plazenta

Die Primärzotten (primäre Trophoblastzotte) bilden sich etwa zwischen dem 12. und 13. Tag. Hierbei dringen Zytotrophoblasten in die Fortsätze der Synzytiotrophoblasten ein. Zur Bildung der Sekundärzotten kommt es durch das Eindringen von extraembryonalem Mesoblasten in die Primärzotten ab dem 16. Tag post conceptionem. Gegen Ende der 3. Schwangerschaftswoche differenziert sich das in den Sekundärzotten befindliche Zottenmesoblast zu Bindegewebe und Blutgefäßen. Sobald differenzierte Blutgefäße in den Zotten vorhanden sind, spricht

man von Tertiärzotten. In diesem Stadium besteht die Plazentaschranke aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, lockerem Bindegewebe um das Endothel und Kapillarendothel. Die Tertiärzotten ragen entweder frei in die mit Blut gefüllten Sinusoide hinein (freie Zotten) oder sie dienen der Verankerung mit der Basalplatte (Haftzotten). Die Terminalzotten bilden sich mit dem Verschwinden der Zytotrophoblasten aus den Wänden der Tertiärzotten nach dem 4. Monat.

1.5.3 Entwicklung der Zotten

Nach Abschluss der 4. Schwangerschaftswoche sind alle Zotten zu Tertiärzotten umgebildet. Ab der 9. bis 16. Schwangerschaftswoche erfahren die Tertiärzotten eine Verlängerung und vernetzen sich durch zunehmende Proliferation. Ziel ist die Ausbildung intermediärer unreifer Zotten, welche ihrerseits die Bildung von Trophoblastenknospen anregt. Diese Trophoblastenknospen wiederum induzieren die Bildung neuer Zotten. Ab der 26. Woche bilden sich reife intermediäre Zotten mit einem stärker ausgebildeten fetalen Kapillarnetz, auf der Grundlage der Tertiärzotten. Diese reifen intermediären Zotten bilden kleine Vernetzungen, die terminale oder freie Zotten genannt werden. Im 3. Entwicklungsmonat bleiben nur die Zotten (Tertiärzotten) der Basalplatte erhalten und das Chorion entwickelt sich hier zum Chorion frondosum (zottenreiches Chorion) und ist Bestandteil der Plazenta. An den Stellen wo es zur Degeneration der Zotten kommt, kommt es zur Ausbildung des Chorion laeve (glattes Chorion). Hier findet kein Stoffaustausch zwischen Mutter und Fötus mehr statt.

In der ausgereiften Plazenta gegen Ende der Schwangerschaft finden sich sechs Zottentypen. Die Haftzotten die für mechanische Stabilität und Verankerung der Plazenta sorgen. Die Tertiärzotten zur Steuerung des Längenwachstums des Zottenbaumes. Die unreifen intermediären Zotten als Proliferationszonen der Trophoblasten. Die freien Zotten, aus reifen intermediären Zotten hervorgegangen, nehmen etwa 40% des Plazentavolumens ein und stellen 50% der Austauschoberfläche bei Geburt. Die gesamte plazentäre Austauschoberfläche beträgt etwa 12 m².

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es PTPIP51 in vivo im Verlauf der Plazentaentwicklung während der Schwangerschaft zu untersuchen. Ein weiteres Ziel lag darin, die funktionellen Einflüsse auf die Lokalisation von PTPIP51 und ihrer Interaktionspartner PTP1B, 14-3-3 β , c-Src und Raf-1 zu analysieren. Dies wurde über Doppelimmunofluoreszenzstudien unter besonderer Betrachtung der apoptotischen und proliferativen Zellen, deren essentielle Bedeutung in der plazentalen Entwicklung bekannt ist, durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Kryostat Modell CM1900	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop Modell Axioplan 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
pH-Meter Modell 410 A	Orion, Waltham, Maryland, USA
Analysenwaage Modell Europe 1000	Gilbertini, Mailand, Italien
Wippschüttler Modell Assistent	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Magnetrührer Modell RCT Basic	IKA works, Staufen, Deutschland
Reagenzschüttler Modell MS 1	IKA works, Staufen, Deutschland
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Zentrifuge Modell Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA, Staufen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die gängigen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) in analytischer Qualität bezogen. Die Hersteller spezieller Chemikalien, Antikörper und anderer Reagenzien sind an entsprechender Stelle genannt.

2.1.3 Verwendete Pufferlösungen

Laemmli-Puffer pH 6,8	63 mMolarer TRIS ($C_4H_{11}NO_3$) HCl pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren 2,5% Natrium Dodecylsulfat (SDS) 5% Glycerol 0,005% Bromphenol Blau
NTB-Puffer Nitroblautetrazoliumchlorid-Puffer pH 9,6	12,1g TRIS HCl 5,84g NaCl in 1l Aqua bidest. gelöst pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren 1ml DEPC Wasser vor Gebrauch 25ml 1 Molare $MgCl_2$ -Lösung pro 500ml zugeben
PBS-Puffer Phosphat buffered Saline pH 7,4 0,1 Molar	2,72g KH_2HPO_4 14,24g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 9g NaC in 1l Aqua bidest. gelöst pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren
SSC-Puffer pH 7,4	4,41g $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ 8,76g NaCl in 1l Aqua bidest. gelöst 1ml DEPC Wasser pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren
TNMT-Puffer TRIS-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base pH 7,5	12,11g TRIS-HCl 5,84g NaCl 0,417g $MgCl_2$ in 1l Aqua bidest. gelöst pH-Wert mit pH-Meter kontrollieren 1ml DEPC Wasser 0,5ml Triton X 100

2.1.4 Eindeckmedium

Mowiol	6g Glycerol 2,4g Mowiol 4-88 (Calbiochem # 475904, Merck Biosciences, Darmstadt) 6ml destilliertes Wasser 12ml 0,2 M TRIS Puffer pH 8
---------------	---

2.1.5 Probenmaterial

Für die hier vorliegende Arbeit wurden ausschließlich humane Plazentaprobe aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Schwangerschaft herangezogen. Sämtliche Proben stammten aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Giessen-Marburg GmbH, Standort Giessen. Die Verwendung menschlicher Plazenten für die aufgeführten Untersuchungen wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität in Giessen genehmigt (Antrag-Nr.: 161/07). Die Plazentaprobe aus dem 1. Trimenon (n=4; 9, 9, 10 und 11 Schwangerschaftswoche) stammen von Interruptiones, die des 2. Trimenon (n=3; 20, 23 und 27 Schwangerschaftswoche) von Aborten. Die Plazentaprobe des 3. Trimenon (n=7; 36 bis 40 Schwangerschaftswoche) stammen von Schnittenbindungen auf Grund einer Steißlage des Kindes von Frauen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf. Keine der untersuchten Plazenten wies histologische Veränderungen auf.

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme der Proben

Soweit möglich sind aus jeder Plazenta mehrere etwa 1cm² große Stücke in fetal nach maternaler Orientierung heraus geschnitten worden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Proben etwa alle im selben Abstand zur Nabelschnur entnommen wurden. Die Proben sind an Ort und Stelle unverzüglich in schmelzendem Isopentan (Fluka, Steinheim, Deutschland), welches in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, eingefroren worden. Die Gewebeprobe wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung

bei -80°C gelagert. Die Fixierung der nativen Gewebe erfolgte bei der Schnittherstellung (siehe unten).

2.2.2 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.2.1 RNA-Isolation

Es wurden Proben von unterschiedlichen Plazenten homogenisiert. Anschließend erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA nach dem Standardprotokoll des Herstellers des RNeasy Kit MINI (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt, auf 1µg/µl mit Aqua dest. verdünnt und die Lösung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Omniscript (Qiagen, Hilden, Deutschland) und nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.3. Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Vervielfältigung von DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion nach Mullis et al. (1986) und Saiki et al. (1988) durchgeführt.

Die PCR wurde in einem iCycler mit SYBR Green Supermix (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Die Zyklusbedingungen waren 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 30 Sekunden, 55 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden. Zur Synthese wurden 2 µl der isolierten cDNA mit der M-MuLV-reversen Transkriptase (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth) und einem poly-dT18 Primer revers-transkribiert. Für die PCR wurden die folgenden humanspezifischen PTPIP51 Primer (überprüft durch Sequence blasting) benutzt (MWG, Ebersberg, Deutschland): 5'GCAGGTGGTGCTATCAGGTC3' als Forwardprimer und 5'AGCTCCAGGGCCAACTTCATC3' als Reverseprimer. Diese führten zu einem 232 Basenpaare großen Amplifikationsprodukt.

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus: Reaktionspufferlösung, dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP, jeweils 10 mMol), Primern, template DNA und Polymerase in Konzentrationen, die den Angaben des Herstellers entsprechen. Die Amplifikation erfolgte entsprechend einem Standardprotokoll im T-Personal Thermal Cycler (Biometra, Göttingen, Deutschland).

Die Amplifikation eines 90 Basenpaare großen β -Aktinin Produktes gilt als Positivkontrolle, Proben ohne Reverse Transkriptase hingegen als Negativkontrolle.

2.2.3 Western Blot

Western Blots wurden nach Towbin et al. (1979) durchgeführt. Die Plazentaprobe wurden unter Zusatz von zweifach Laemmli-Puffer, 150 mM NaCl, 1% Triton X und Mercapto-Ethanol homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit Laemmli-Puffer aufgefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel (15% Acrylamid). Der Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen (Protran-BA85, Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) erfolgte durch Tank-Blotting, hierbei enthielt der Laufpuffer 20 mM Tris-Base, 150 mM Glyzin, 20% Methanol und 0,1% SDS. Das Tank-Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S (Serva, Heidelberg, Deutschland) gefärbt, um die Effektivität des Elektrotransfers zu überprüfen und um die Position des Markers zu bestimmen. Daran schloss sich ein Waschschrift in TBST-Puffer an.

Anschließend wurde die Membran in 5%igem Magermilchpulver in TBST-Puffer für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur und leichter Bewegung auf dem Wippschüttler inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation der Membran für ebenfalls mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (anti-PTPIP51 1:2000 in 5%igem Magermilchpulver in TBST-Puffer) an.

Es folgte ein dreifacher Waschschrift in TBST-Puffer und die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-rabbit 1:10000 in 5%igem Magermilchpulver in TBST-Puffer), der an eine Meerrettich-Peroxidase konjugiert war. Nach fünfmaligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran in zwei ECL-Lösungen getaucht:

Lösung 1: 100mM Tris-HCL, pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 400 μ M p-Coumarinsäure;
Lösung 2: 100mM Tris-HCL, pH 8,5, 0,02% H₂O₂ in einem Verhältnis von 1:1 für ungefähr eine Minute. Als letzter Schritt erfolgte die Detektion durch Chemielumineszenz mit dem Las3000Imager digital system (Fuji, Düsseldorf, Deutschland). Das Membran Stripping erfolgte durch Inkubation der Membran in Stripping Puffer (62,5 mM Tris-HCL, pH 6,7, 7 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) für 20 Minuten bei 56°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Daran schloss sich ein fünffacher Waschschrift in TBST-Puffer um das β -Mercaptoethanol vor der Inkubation mit den Antikörpern zu entfernen. Für das Stripping wurden folgende Antikörper verwendet: polyclonaler anti-PTPIP51 (siehe oben). Zum Abgleich der Banden wurde ein Molekulargewichtsmarker (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, Cat. No. SM0431) eingesetzt.

2.2.4 Histologie

2.2.4.1 Kryostatschnittherstellung

Es wurden 6 – 10 μ m dicke Serienschnitte der Plazentaprobe mittels eines Kryostaten (siehe oben) angefertigt und auf Objektträger (Superfrost Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgenommen. Diese Schnitte wurden für zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert und anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet. Die weitere Bearbeitung erfolgte entweder direkt oder die Schnitte wurden bei -20°C zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Auf den Objektträgern befanden sich mindestens vier Schnitte. Pro Plazenta wurden etwa zwanzig Objektträger angelegt.

2.2.4.2 Immunhistochemie

Es wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Hier ist im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz der Primärantikörper nicht mit einem Fluorochrom markiert. So wird eine größere Sensitivität und eine höhere Flexibilität

beim Einsatz der Detektionssysteme erreicht. Ausnahme war der Antikörper gegen α -SMA, der direkt Fitc konjugiert war.

Die Schnitte wurden vor der Färbung mit dem Pap Pen (SCI Sciences Services, München, Deutschland) umfahren. Anschließend begann die Aufarbeitung der Schnitte mit der Zugabe des Primärantikörpers gegen das Protein PTPIP51. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper wurde in dem Labor von Herrn Prof. Dr. W. Hofer (Universität Konstanz), durch Einsatz eines gereinigten und rekombinanten Proteinfragmentes von PTPIP51, über eine 35 tägige Immunisierung eines Kaninchens gewonnen und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Antikörper war zuvor von Herrn Prof. Dr. W. Hofer charakterisiert und in mehreren Studien verwendet worden (Welte 2000, Stenzinger et al. 2005, 2006, 2007). Als optimale Verdünnung hat sich eine Verdünnung des Antikörpers im Verhältnis 1:250 zur Blocklösung ergeben. Die Blocklösung setzte sich wie folgt zusammen: 10 % normales Ziegen Serum, 5 % Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1 % Cold Water Fish Skin Gelatine in PBS. Diese Lösung diente dem Ausschalten zusätzlicher unspezifischer Proteinbindungsstellen (Hauri und Bucher 1986). Vor der Zugabe der Antikörper wurde der Blocklösung normales Ziegen Serum (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Endkonzentration von 5 % hinzugefügt.

Pro Schnitt wurde eine Menge von 50 μ l benötigt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 24 Stunden bei Raumtemperatur in völliger Dunkelheit. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls in dieser feuchten Kammer durchgeführt. Als interne Negativkontrolle wurde ein Schnitt je Objektträger lediglich mit Blocklösung ohne Primärantikörper inkubiert. Diese Kontrolle diente dem Nachweis unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers.

Nach drei zehnminütigen Waschvorgängen mit PBS zur Entfernung überschüssigen Primärantikörpers wurden alle Schnitte inklusive der Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper Alexa fluor 555 Excitationsmaximum 555 und Emissionsmaximum 565 (goat-anti-rabbit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) im Falle von Doppelfärbungen, soweit nicht anders genannt, zusätzlich mit Alexa Fluor 488 Excitationsmaximum 491 und Emissionsmaximum 515 (goat-anti-mouse, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einem Verhältnis von 1:400 bzw. im Falle

des zweiten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:800 in der oben beschriebenen Blocklösung erneut für 1h bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte noch einmal dreifach für zehn Minuten in einer Standkuvette mit PBS gewaschen und schließlich für eine Minute mit 4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid-Methanol (DAPI-Methanol) (Boehringer Mannheim, Deutschland), einem fluoreszierenden DNA Farbstoff, überschichtet. Nun wurden die Schnitte kurz in PBS gespült und mit gepuffertem Mowiol (pH 8,6) (Polyvinylalkohol 4-88, Fluka, Steinheim, Deutschland) als Medium eingedeckelt (Deckgläser: Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland). Zur Stabilisierung der Immunfluoreszenz wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Doppelimmunfärbungen erfolgten mit dem Antikörper gegen PTPIP51 in Kombination mit einem monoklonalem Antikörper gegen PTP1B (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), CD14 (Dako, Glostrup, Denmark), Ki-67 (Dako, Glostrup, Denmark), Actin Smooth Muscle-Fitc (α -sma) (Sigma, Deisenhofen, Germany), van Willebrand Faktor (vWF) (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany), Cytokeratintine Peptide 7 (CK7) (Sigma, Deisenhofen, Germany), M30 CytoDeath (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany), 14-3-3 β (Santa Cruz, Kalifornien, USA), Raf-1 (Santa Cruz, Kalifornien, USA) und c-Src (Santa Cruz, Kalifornien, USA) oder mit Caspase-3 p20 (Santa Cruz, Kalifornien, USA) einem polyclonalem Antikörper.

Bei Doppelimmunfluoreszenzen erfolgte die Inkubation mit den beiden Primärantikörpern, wenn diese unterschiedlichen Spezies entstammten, gleichzeitig, das heißt die Antikörper wurden gepoolt in entsprechender Verdünnung in Blocklösung angesetzt. Die weiteren Schritte entsprachen dem Vorgehen bei Inkubation mit nur einem Primärantikörper. Für die Detektion der beiden Primärantikörper wurden wieder beide Sekundärantikörper gemeinsam eingesetzt. Der weitere Ablauf war identisch zum Vorgehen bei Inkubation mit nur einem Antikörper. Bei Doppelimmunfärbungen mit Primärantikörpern der gleichen Spezies, erfolgte erst die Immunfärbung für den ersten Primärantikörper inklusive des Sekundärantikörpers wie oben beschrieben. Anschließend folgten Waschschrte in einer Standkuvette von dreimal zehn Minuten in PBS, dreimal zehn Minuten mit 4%igem PFA in PBS und dreimal zehn Minuten mit 0,1%igem Glycin in PBS. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper und dem zweiten

Sekundärantikörper (siehe oben). Als zusätzlicher Sekundärantikörper bei Immunfärbungen bei gleicher Spezies-Herkunft wurde Cy3 Excitationsmaximum von 550 nm und Emissionsmaximum bei 570 nm (donkey-anti-mouse, Dianova, Hamburg, Germany) in einer Verdünnung von 1:800 wie oben beschrieben verwendet. Die zugehörigen Negativkontrollen werden in der Arbeit nicht gezeigt. Sie dienen dem Ausschluss unspezifischer Reaktionen des Sekundärantikörpers.

Nach der Auswertung der Immunhistochemie wurden von einigen Objektträgern die Deckgläser entfernt und eine H&E Gegenfärbung angefertigt, um H&E Bilder der gleichen Schnitte zu erhalten.

2.2.4.3 Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Herkunft	Clone	Verdünnung	Hersteller
PTPIP 51 Human cDNA sequence encoding amino acids 131-470 of PTPIP51	Rabbit polyclonal		1:500	Prof. HW Hofer, Biochemical Department University Konstanz, Germany
CD 14 Human	Mouse monoclonal	TÜK 4	1:20	Dako Denmark # M 0825
PTPase 1B Human recombinant protein tyrosine phosphatase 1B (PTPase 1B)	Mouse monoclonal	AE4-2J	1:20	CALBIOCHEM Germany #PHO2
Ki-67 Human recombinant peptide corresponding to a 1002 bp ki-67 cDNA fragment	Mouse monoclonal	MIB-1	1:100	Dako Denmark # M 7240
α Smooth Muscle-Fitc N-terminal synthetic decapeptide of α -smooth muscle actin	Mouse monoclonal	1A4	1:500	Sigma Germany # F 3777
van Willebrand Factor Isolated from human plasma	Mouse monoclonal	NMC-4	1:100	Roche Germany # 1284924
Cytokeratine Peptide 7 RT4 human bladder carcinoma cell line	Mouse monoclonal	LDS68	1:200	Sigma Germany # C6417
M30 CytoDEATH Caspase-cleaved epitope of the cytokeratine 18	Mouse monoclonal	M30	1:100	Roche Germany # 12140322001
Caspase-3 p20 C-terminus of caspase-3 p20 of human	Goat Polyclonal		1:250	Santa Cruz USA # sc-1225
14-3-3β C-terminus of 14-3-3 β of human origin	Mouse monoclonal	A-6	1:100	Santa Cruz USA # sc-25276
Raf-1 C-terminus	Mouse monoclonal	E-10	1:100	Santa Cruz USA # sc-7267
c-Src against fulllength recombinant c-Src of human origin	Mouse monoclonal	17AT28	1:100	Santa Cruz USA # sc-130124

4.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) wurden die zuvor immungefärbten Schnitte vorsichtig ausgedeckelt und weiterverarbeitet.

Nach 10 min spülen in PBS-Puffer erfolgte einmaliges abspülen mit Aqua dest.. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Mayer in einem Verdünnungsverhältnis 1:10. Nach 10 min Bläuen unter fließendem lauwarmen Wasser, kurzes spülen in Aqua dest.. Nun Gegenfärbung mit 0,1%igem wässrigen Eosin für 3 min, gefolgt von kurzem Abspülen mit Aqua dest. und Entwässern mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Vor dem Eindeckeln mit DePeX (Houten, Niederlande) wurde noch zwei mal 5 min in Xylol gespült.

2.2.4.5 TUNEL-Assay

Um apoptotische Zellen in der Plazenta nachzuweisen, wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt.

Während apoptotischer Prozesse kommt es zur Fragmentation der DNA. Die DNA-Strangbrüche führen zum Vorhandensein freier 3'-OH Enden der DNA im Nucleus sowie in apoptotischen Körperchen. Bei proliferierenden - oder normalen Zellen liegt die Anzahl der freien 3'-OH Enden meist auf so niedrigem Niveau, dass sie von dem Detektionssystem nicht erkannt werden.

Das hier verwendete ApoTag (Chemicon International, Temecula, USA, #S7110) erkennt sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche apoptotischer Zellen.

Das Prinzip des TUNEL-Assays beruht auf der Erkennung der freien 3'-OH Enden durch die terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT). Dieses Enzym katalysiert die Verlängerung der 3'-OH Enden mit Desoxy Uridintriphosphat (dUTP) Resten, die bei dem hier verwendeten Testsystem ein Oligomer bilden, das aus einer willkürlichen Mischung aus Digoxigenin gekoppelten – und unmarkierten dUTP Resten besteht. Das Verhältnis der dUTP Reste ist hierbei so eingestellt, dass es im anschließenden Schritt zu einer optimalen Bindung von anti-Digoxigenin gekoppelten Antikörpern kommt. Diese lassen sich dann mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen. Die Herstellung der immunhistologischen Schnitte erfolgte wie oben beschrieben. Als erster Schritt erfolgte die Fixierung der einzelnen Schnitte in 1%

Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger zweimalig für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Postfixation diente eine auf -20°C vorgekühlte Mischung von Ethanol und Acetat im Verhältnis von 2:1. Es erfolgte ein erneuter zweimaliger Waschschrift von zwei Minuten in PBS.

Die nach dem Waschvorgang vorhandene Flüssigkeit wurde vorsichtig abgesaugt. Als nächster Schritt wurde unverzüglich der im Detektionskit enthaltene Äquilibrierungspuffer in einer Menge von 75µl pro 5cm² aufgetragen. Dieser wurde für mindestens 10 Sekunden bei Raumtemperatur auf den einzelnen Schnitten belassen. Der Puffer wurde anschließend vorsichtig abgesaugt. Es erfolgte direkt das pipettieren von 55µl der Arbeitsverdünnung des TdT pro 5cm². Diese wurde vorher durch Mischen von 33 µl TdT Konzentrat mit 77 µl Reaktionspuffer, der im Kit enthalten war, hergestellt. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte in einer Küvette mit dem Stop/Wasch Puffer (im Kit enthalten) für 10 Minuten gespült. Der Puffer wurde in folgender Arbeitsverdünnung verwandt: 1ml des Stop/Wasch-Puffer Konzentrates auf 34ml Aqua bidest.. Hieran schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang in PBS für jeweils 1 Minute an. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden 65µl pro 5cm² der Arbeitsverdünnung (62 µl Antikörperkonzentrat in 68 µl Blocklösung) des anti-Digoxigenin (Excitationsmaximum: 490nm, Emissionmaximum: 520nm) konjugierten Antikörpers hinzugegeben und die Objektträger bei Dunkelheit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter viermaliger Spülvorgang für jeweils 2 Minuten in PBS.

Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI-Methanol markiert (siehe oben) und die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

2.2.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisation der Immunreaktion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit dem oben genannten Auflichtfluoreszenzmikroskop.

Für die Darstellung des Alexa Fluor 555 markierten Antikörpers im Schnitt wurde ein Anregungsfilter mit dem Spektrum von 525-560 benutzt. Durch die Verwendung eines Sperrfilters mit einem Spektrum von 570-650 wurden alle weiteren, störenden Lichtphänomene ausgeblendet. Für Alexa Fluor 488 umfaßte der Wellenlängenbereich des Erregungsfilters 460-490nm und des Sperrfilters 515-550nm. Zur weiteren zellulären Lokalisation des PTPIP51 wurden die Kerne in den immunfluoreszenz markierten Proben wie oben beschrieben mit DAPI-Methanol gegengefärbt. Die Auswertung dieser Färbung erfolgte im UV-Licht mit einem Anregungsfilter mit einem Spektrum von 360-370nm und einem Sperrfilter im Spektrum 420-450nm.

Für die Darstellung des TUNEL-Assays wurde ein Anregungsfilter mit einem Spektrum von 460-490nm und ein Sperrfilter mit einem Spektrum von 515-550nm verwendet.

2.2.4.7 Dokumentation

Die am Mikroskop gewonnen Bilder wurden über ein digitales Kamera System (Axio cam HR, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) am Mikroskop mit einem Computer aufgezeichnet. Die Daten wurden als TIFF-Dateien erfasst und konnten gespeichert werden.

2.2.5 In situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung wurde nach Protokollen von Steger et al. (1998, 2000) durchgeführt. Die zur in situ Hybridisierung vorgesehenen Schnitte wurden auf die gleiche Weise vorbereitet, wie die oben beschriebenen. Zur Prähybridisierung, die der Erhöhung der Permeabilität der Plazentazellen dient, wurden die Objektträger für zehn Minuten in PBS mit 0,25% Triton X 100 und 0,25% Nodidet P-40 gegeben. Als nächster Schritt erfolgte eine einstündige Inkubation in 20% Glycerol. Die Hybridisierung wurde mit DIG markierten Sense- und Antisense c-RNA-Proben in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren 1x 94°C für 3 Minuten, 35x 94°C für 30 Sekunden, 66°C für 30 Sekunden, 72°C für

60 Sekunden und 1x 72°C für 8 Minuten bei Benutzung von 5'GTCTCTCACCTGAGCTGGCTAGA3' als Forwardprimer und 5'GGATAGCCAAATCCTCCTTCGTGA3' als Reverseprimer. Hierbei wurde ein Sondengemisch mit den cRNA-Proben, 10 µg/ml Salmon-Sperm-DANN (Sigma, München, Deutschland) und 10 µg/ml Yeast tRNA (Sigma, München, Deutschland) verwendet. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 50% deionisiertem Formamid, 10% Dextransulfat, zweifach SSC und Denhardt-Reagenz (2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon, fertig zu beziehen bei Sigma, München, Deutschland).

Das Sondengemisch wurde mit dem Puffer auf die Objektträger mit den Schnitten gegeben und diese anschließend für 10 Minuten auf einer Heizplatte bei 70°C abgelegt. Anschließend wurden die Gewebe mit einem Kühlakku abgeschreckt und in einer Hybridisierungskammer über Nacht bei 42°C inkubiert.

Die Posthybridisierung wurde nach Lewis und Wells (1992) durch einen vierfachen zehnminütigen Waschvorgang in vierfach konzentriertem SSC-Puffer bei 42°C eingeleitet. Daran anschließend erfolgte ein weiterer fünfzehnminütiger Waschvorgang in zweifachem SSC-Puffer bei 60°C gefolgt von einem gleich langen Waschvorgang in 0,2fachem SSC-Puffer bei 42°C. Die beiden letzten, abschließenden Waschvorgänge erfolgten in 0,1fachem und zweifachem SSC-Puffer für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Zur Färbung der gebundenen Sonden wurden die Proben für 10 Minuten in TNMT-Puffer gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 3%igem BSA-Blockpuffer bei Raumtemperatur. In einer Nasszelle wurden die Schnitte dann mit dem Sekundärantikörper Anti-DIG-Fab (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:500 in 1%igem BSA-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein zweifacher jeweils zehnminütiger Waschvorgang in TNMT-Puffer, ein fünfminütiger Waschvorgang in NTB-Puffer, weitere fünf Minuten in Levamisol und ein abschließender Waschvorgang in NTB-Puffer.

Das Entwickeln mit Nitro Blau Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (NTB-BCIP-Lösung, KPL, Gaithersbur, MD, USA) erfolgte in vollständiger Dunkelheit, wobei sich die dafür benötigte Entwicklungszeit als äußerst variabel erwies (Minuten-Stunden).

Als letzte Schritte folgten dann noch ein fünfminütiger Waschvorgang in Levamisol gefolgt von fünf Minuten Waschen in NTB-Puffer. Nach kurzem Spülen in Aqua bidest. wurden die Schnitte in Glycergel (Dako, Hamburg, Deutschland) eingedeckelt.

3 Ergebnisse

Expression der PTPIP51 in humanem Plazentagewebe:

3.1 RT-PCR und Immunoblotting

PTPIP51-mRNA konnte mittels der reversen polymerasen Kettenreaktion (RT-PCR) in Proben von Plazenten dreier verschiedener Reifestadien, erstes, zweites Trimester und in vollständig ausgereiften (drittes Trimester), nachgewiesen werden (Abb. 1). Der Nachweis der β -Aktinin mRNA diente als interne Positivkontrolle. Ein Nachweis des PTPIP51 Proteins in Plazentagewebe erfolgte mittels Immunoblotting. Proben der reifen Plazenta wiesen PTPIP51 Protein in verschiedenen molekularen Größen auf. Dabei handelte es sich um drei Isoformen des PTPIP51 mit den Molekulargewichten von 52 kDa, 45 kDa und 28 kDa (Abb. 1).

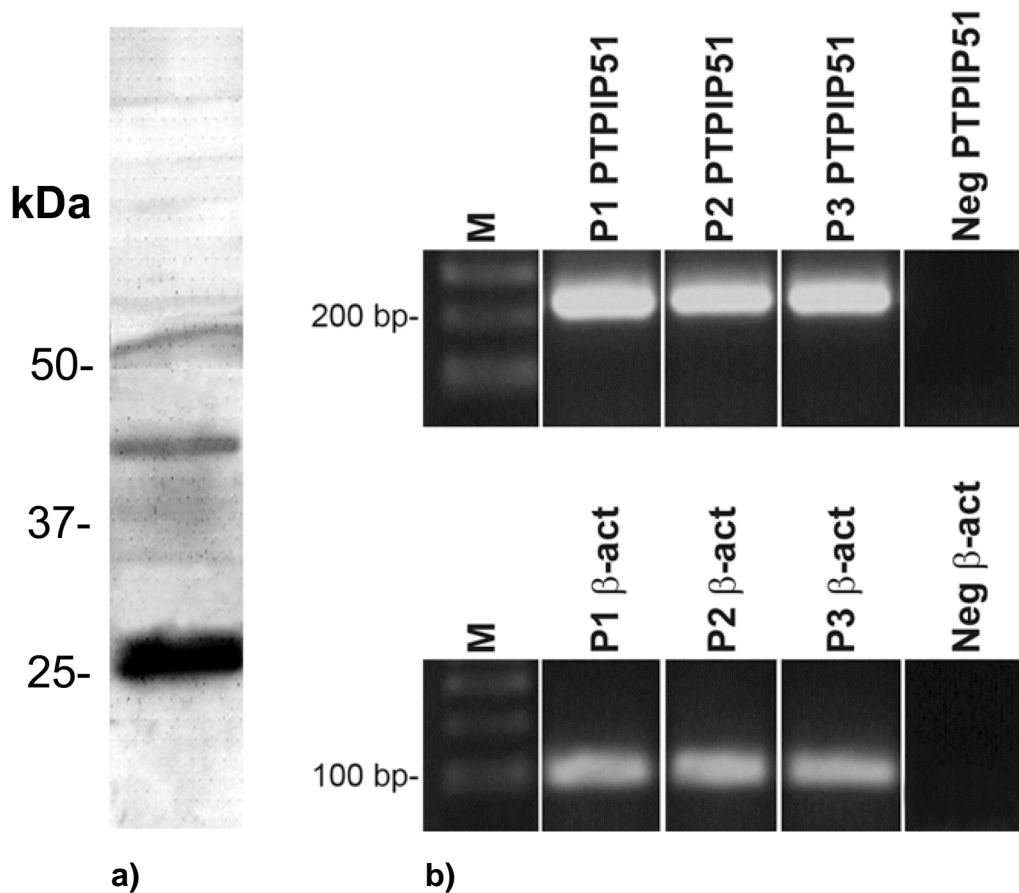


Abbildung 1: Immunoblotting und RT-PCR von PTPIP51 in der humanen Plazenta

a) Immunoblotting von Proben reifer Plazenta mit PTPIP51 Antigen

b) oberer Teil: PTPIP51 mRNA in Proben des ersten (P1), des zweiten (P2) und des dritten (P3) Trimesters.

unterer Teil: β -Aktinin mRNA als interne Positivkontrolle und Proben ohne reverse Transkriptase als negativ Kontrolle (Neg), Marker (M)

3.2 In situ Hybridisierung

Die zellspezifische Expression von PTPIP51-mRNA in der reifen Plazenta wurde mittels in situ Hybridisierung (Abb. 2) untersucht. Eine interne Negativkontrolle erfolgte über die Hybridisierung mit einer Sense-Sonde (Abb. 2b).

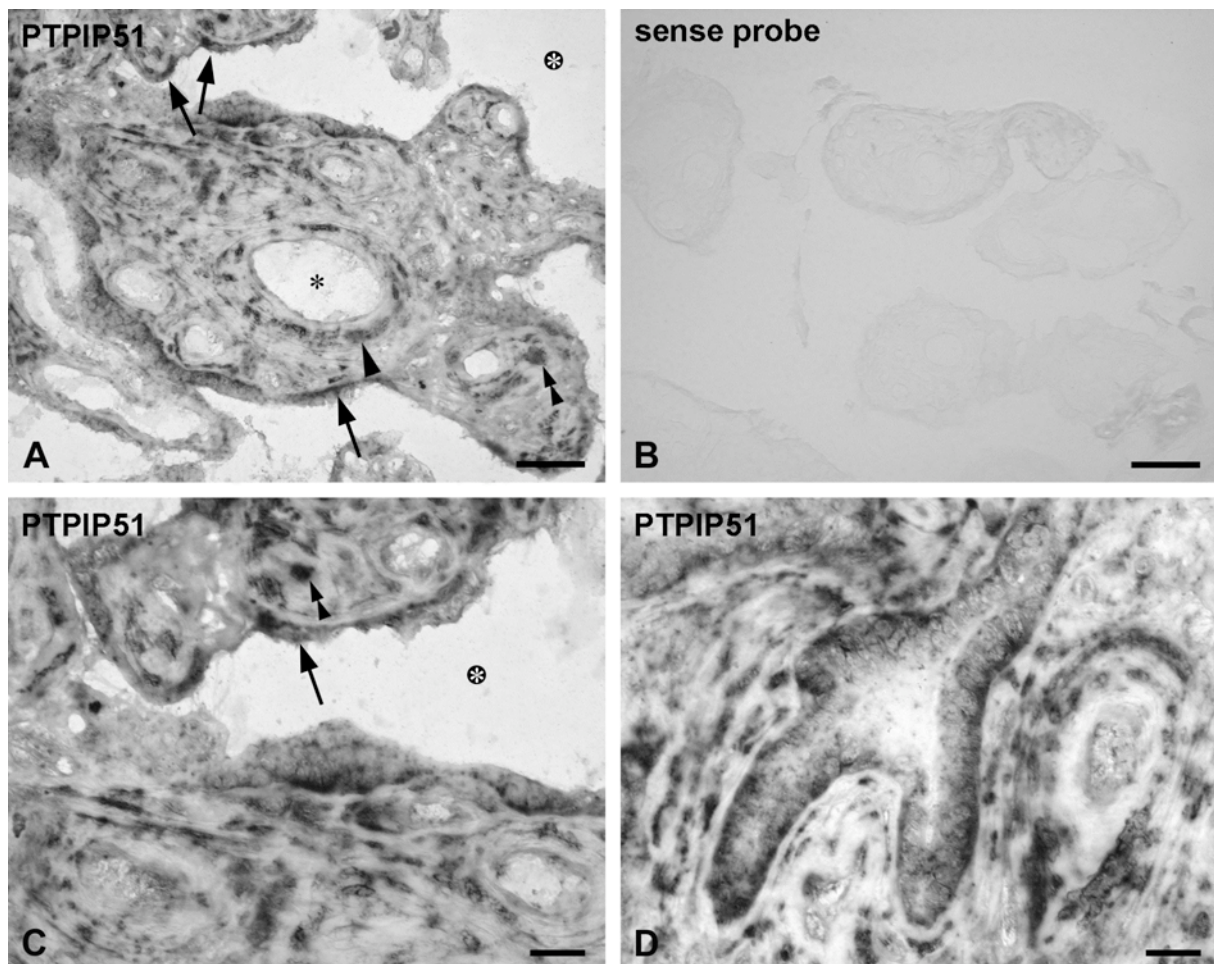


Abbildung 2: In situ Hybridisierung von PTPIP51 von der reifen Plazenta

- A) Antisense Probe, Übersicht, Balken: 50 μ m
- B) Sense Probe, Übersicht, Balken: 50 μ m
- C) Antisense Probe, Balken: 20 μ m
- D) Antisense Probe, Balken: 20 μ m

Pfeile: Synzytiotrophoblast, *Pfeilspitze:* glatte Muskelzelle, *doppelte Pfeilspitze:* Stromazelle, *schwarzer Stern:* intravillöses Gefäß, *weißer Stern:* extravillöser Raum

3.3 PTPIP51 in der humanen Plazenta

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation des PTPIP51 wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das PTPIP51 Antigen an Proben von Plazenten verschiedener Reifegrade eingesetzt. Während der Synzytiotrophoblast des ersten und zweiten Trimesters nur eine spärliche bis gar keine Reaktion gegen den PTPIP51-Antikörper zeigte (Abb. 3 A, D), war die Expression von PTPIP51 mRNA (Abb. 2 A, C, D) und Protein (Abb. 3 G) in einem Teil der villösen Synzytiotrophoblasten in der reifen Plazenta stark ausgeprägt.

Im Gegensatz dazu zeigten die Zytotrophoblasten ein entgegengesetztes Expressionsmuster. Zytotrophoblasten des ersten und zweiten Trimenons zeigten eine starke Reaktion gegen den PTPIP51 Antikörper (Abb. 3 A, D), wohingegen Proben des dritten Trimesters eine leicht abgeschwächte Expression des Protein PTPIP51 und der mRNA zeigten (Abb. 2 A, C, D; 3 G).

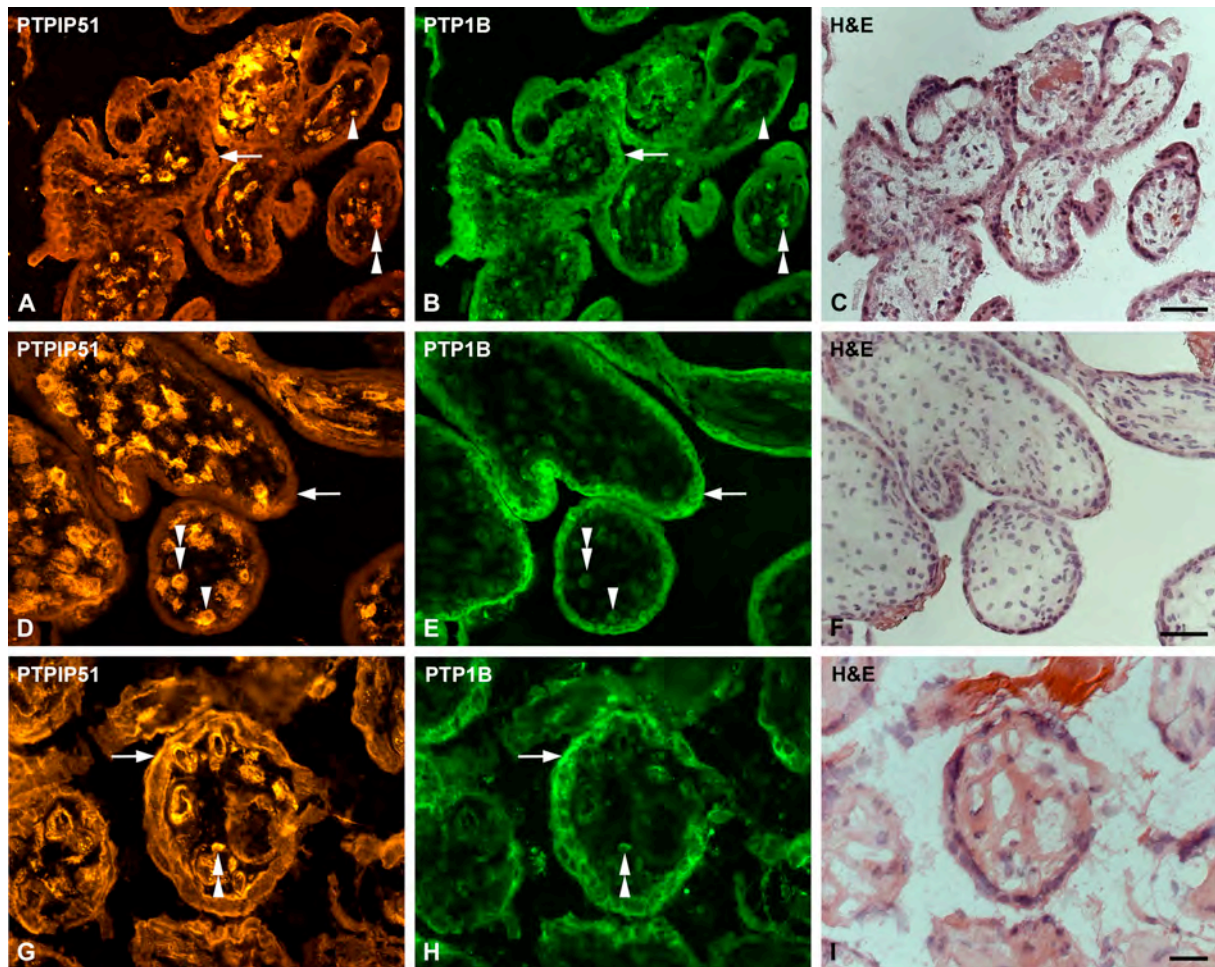


Abbildung 3: Doppelimmunfärbung mit PTPIP51 und PTP1B von der humanen Plazenta

- A) PTPIP51 Immunfärbung 9 Schwangerschaftswoche
- B) PTP1B Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) H&E Färbung des in A verwendeten Schnittes, Balken: 20 μ m
- D) PTPIP51 Immunfärbung 20 Schwangerschaftswoche
- E) PTP1B Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes
- F) H&E Färbung des in D verwendeten Schnittes, Balken: 20 μ m
- G) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- H) PTP1B Immunfärbung des in G verwendeten Schnittes
- I) H&E Färbung des in A verwendeten Schnittes, Balken: 50 μ m

Pfeil: Synzytiotrophoblast, Pfeilspitze: Zytotrophoblast, doppelte Pfeilspitze: Stromazelle

3.4 PTP1B in der humanen Plazenta

Da es sich bei dem PTPIP51 um einen potentiellen Interaktionspartner der PTP1B handelt, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen PTPIP51 und seinen in vitro Interaktionspartner PTP1B durchgeführt. Die Mehrheit der Zytotrophoblasten zeigte während des gesamten Schwangerschaftsverlaufs eine konstante und starke Expression der PTP1B und eine etwas schwächere Expression in den Synzytiotrophoblasten (Abb. 3 B, E, H). Somit lag im ersten und zweiten Trimenon eine Co-Expression der PTPIP51 und der PTP1B in den Zytotrophoblasten vor. Für die reife Plazenta findet sich eine derartige Kolokalisation der beiden Antigene nur im Synzytiotrophoblasten.

Doppelimmunfärbungen mit dem Zytokeratin 7 (CK7) Antikörper, einem Marker für Trophoblasten (Frank et al. 2000), bestätigten dieses Expressionsmuster des PTPIP51 in Zytotrophoblasten (Abb. 4 A, B).

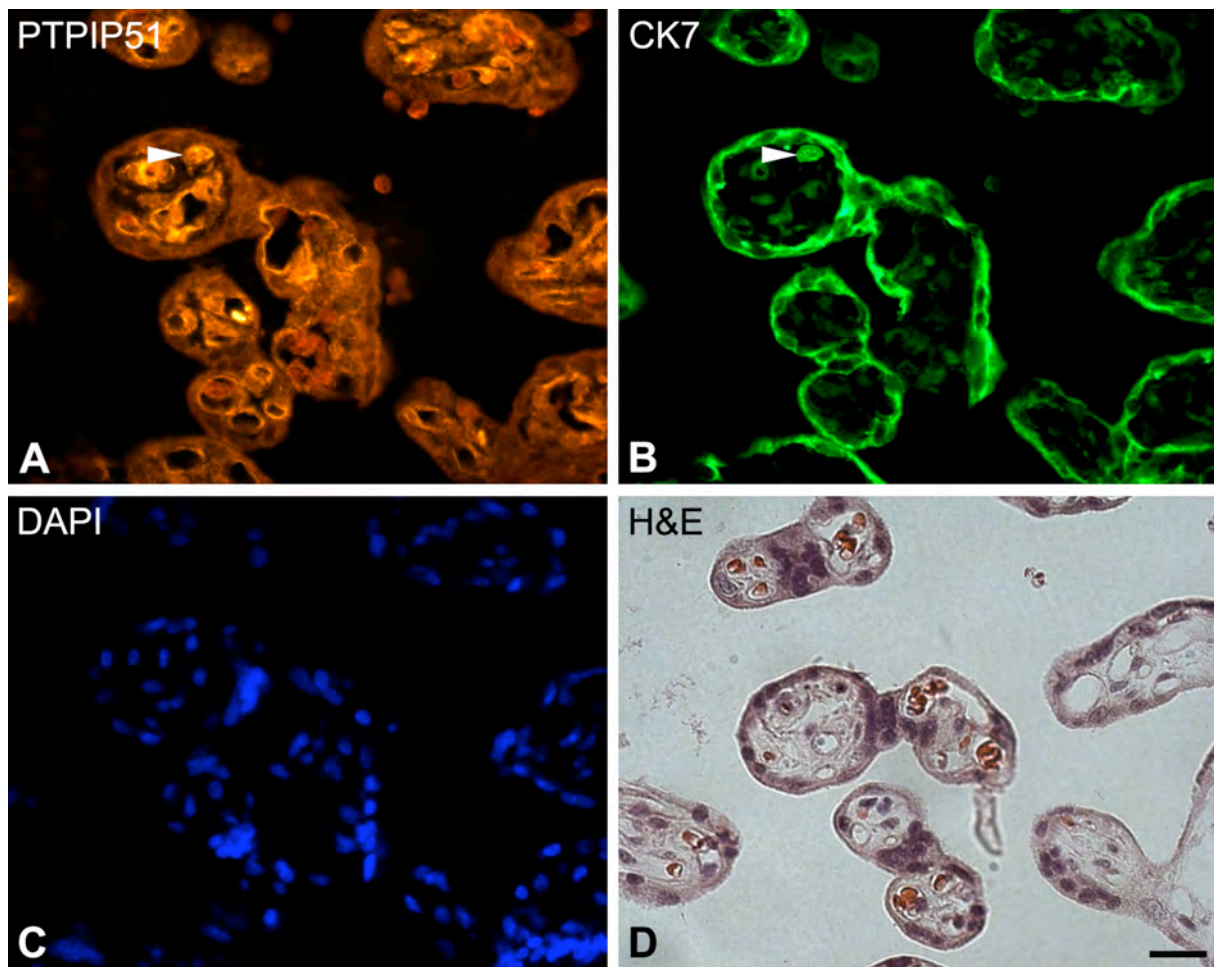


Abbildung 4: Doppelimmunfärbungen mit PTPIP51 und Zytokeratin 7 von der humanen Plazenta (Balken 50 µm)

- A) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- B) Zytokeratin 7 Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes
- D) H&E Färbung

Pfeilspitze: Zytotrophoblast

3.5 PTPIP51 in Gefäßen

PTPIP51 fand sich in kleinen arteriellen und venösen Gefäßen und Kapillaren der Plazenta. Dabei war die Reaktion des PTPIP51 Antikörpers beschränkt auf glatte Muskelzellen, die über den parallelen Nachweis des α -smooth muscle Aktin identifiziert wurden (Abb. 5 A, B), und auf die Endothelien, nachgewiesen durch van

Willebrand-Faktor (Abb. 5 D, E). Dieses Expressionsmuster entsprach den bereits in der *in situ* Hybridization (Abb. 2) beobachteten Ergebnissen und ist in allen Schwangerschaftsstadien zu beobachten.

Interessanterweise konnten auch plazentaspezifische Makrophagen (Hofbauer-Zellen), mittels CD14 Immunreaktivität nachgewiesen, und einige mesenchymale Zellen innerhalb des Stromas der Villi als PTPIP51 positiv detektiert werden. Dies wurde sowohl in Proben des ersten, zweiten und dritten Trimester beobachtet.

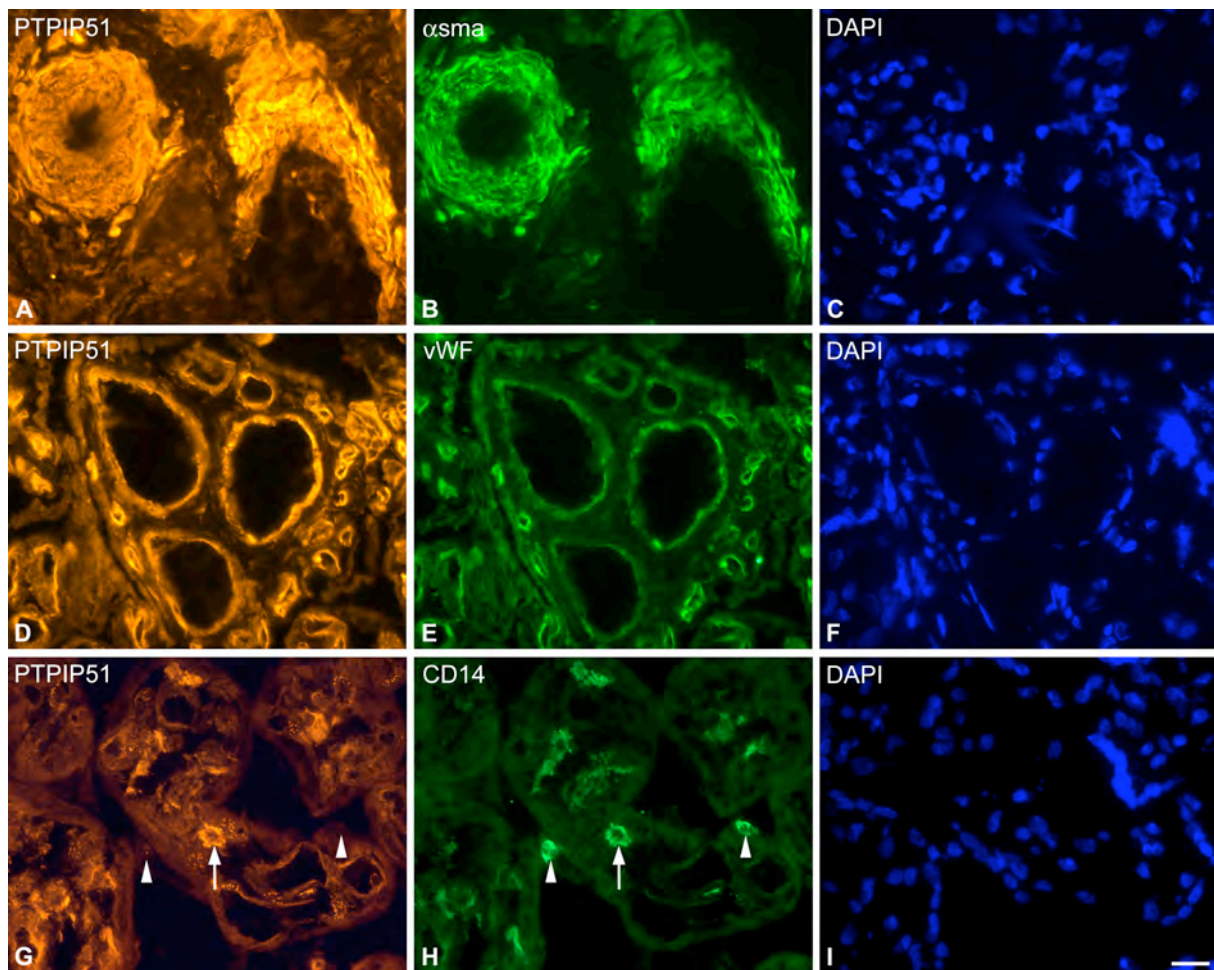


Abbildung 5: Doppelimmunfärbungen mit PTPIP51, α -smooth muscle actin (α -sma), van Willebrand Faktor (vWF) und CD14 in Schnitten humaner Plazenta (Balken: 50 μ m)

- A) PTPIP51 Immunfärbung
- B) α -sma Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes
- D) PTPIP51 Immunfärbung

- E) vWF Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes
 - F) DAPI Färbung des in D verwendeten Schnittes
 - G) PTPIP51 Immunfärbung
 - H) CD14 Immunfärbung des in G verwendeten Schnittes
 - I) DAPI Färbung des in G verwendeten Schnittes
- Pfeil: PTPIP51-positive Hofbauerzellen, Pfeilspitze: PTPIP51-negative Hofbauerzellen

3.6 Apoptose

Wie Lv und Mitarbeiter (2006) gezeigt haben, führt Überexpression des PTPIP51 in kultivierten HEK293T Zellen zu Apoptose. Da Apoptose zum Erhalt des Zellgleichgewichts in allen Stadien der Plazentareifung eine ausgeprägte Rolle spielt, wurden Färbungen mit dem Antikörper gegen das PTPIP51 in Kombination mit dem TUNEL Assay durchgeführt. Während des gesamten Schwangerschaftsverlaufs war PTPIP51 in Synzytiotrophoblasten, die sich im Spätstadium der Apoptose befanden und „syncytial knots“ bildeten, nachweisbar. Außerdem zeigt eine kleine Population von apoptotischen Zytotrophoblasten eine enorme PTPIP51 Reaktivität (Abb. 6 A-K).

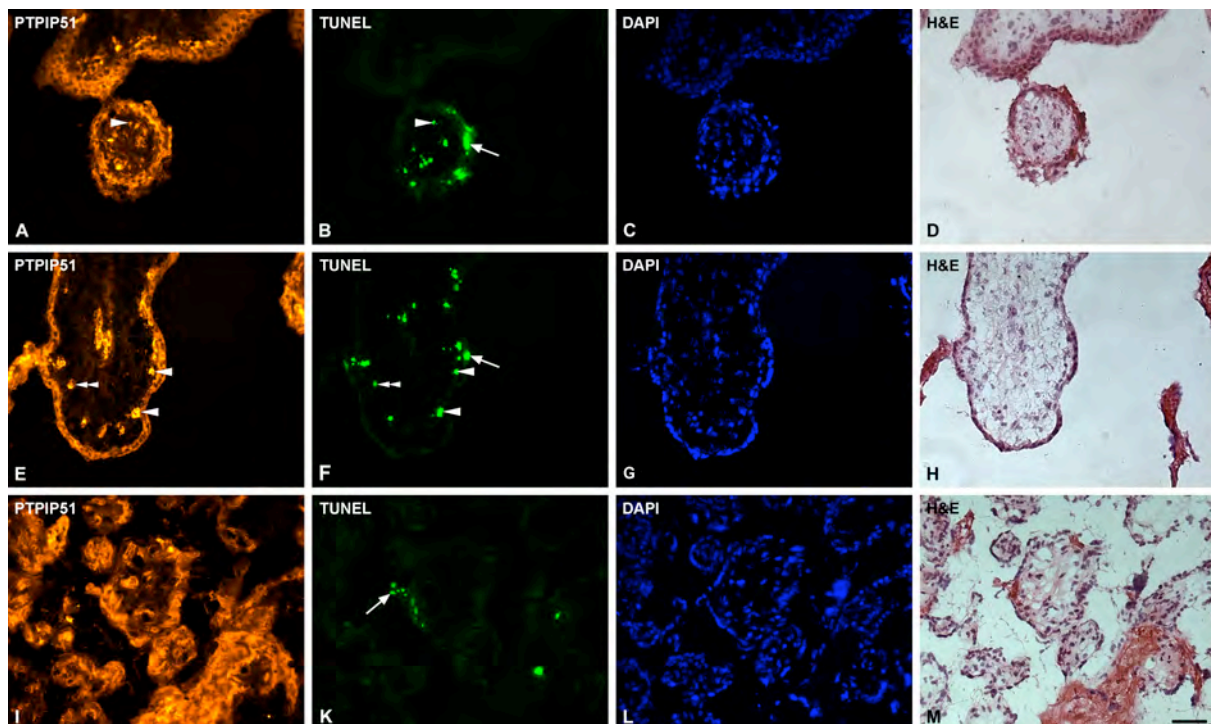


Abbildung 6: Doppelimmunfärbung mit PTPIP51 und TUNEL-markierte Zellen von der

humanen Plazenta (Balken: 50 µm)

- A) PTPIP51 Immunfärbung von der 9 Schwangerschaftswoche
- B) TUNEL Assay des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes
- D) H&E Färbung des in A verwendeten Schnittes
- E) PTPIP51 Immunfärbung von der 20 Schwangerschaftswoche
- F) TUNEL Assay des in E verwendeten Schnittes
- G) DAPI Färbung des in E verwendeten Schnittes
- H) H&E Färbung des in E verwendeten Schnittes
- I) PTPIP51 Immunfärbung von der reifen Plazenta
- K) TUNEL Assay des in I verwendeten Schnittes
- L) DAPI Färbung des in I verwendeten Schnittes
- M) H&E Färbung des in I verwendeten Schnittes

Pfeil: Synzytiotrophoblast, *Pfeilspitze:* Zytotrophoblast, *doppelte Pfeilspitze:* Stromazelle

Ebenso wurde der Nachweis erbracht, dass PTPIP51 auch in Zellen, die sich im Frühstadium der Apoptose befinden, exprimiert wird. Diese Frühstadien der Apoptose wurden über den Nachweis des Zytokeratin 18f (CK18f) (Abb. 7 A, B), sowie der Caspase 3 (nicht gezeigt) identifiziert.

Neben diesen stark PTPIP51 immunpositiven apoptotischen Zellen, waren auch hoch PTPIP51-reaktive Endothel- und glatte Muskelzellen zu sehen. Dabei handelte es sich allerdings um proliferierende Zellen, welche über eine Doppelimmunreaktion mit Ki67 identifiziert wurden.

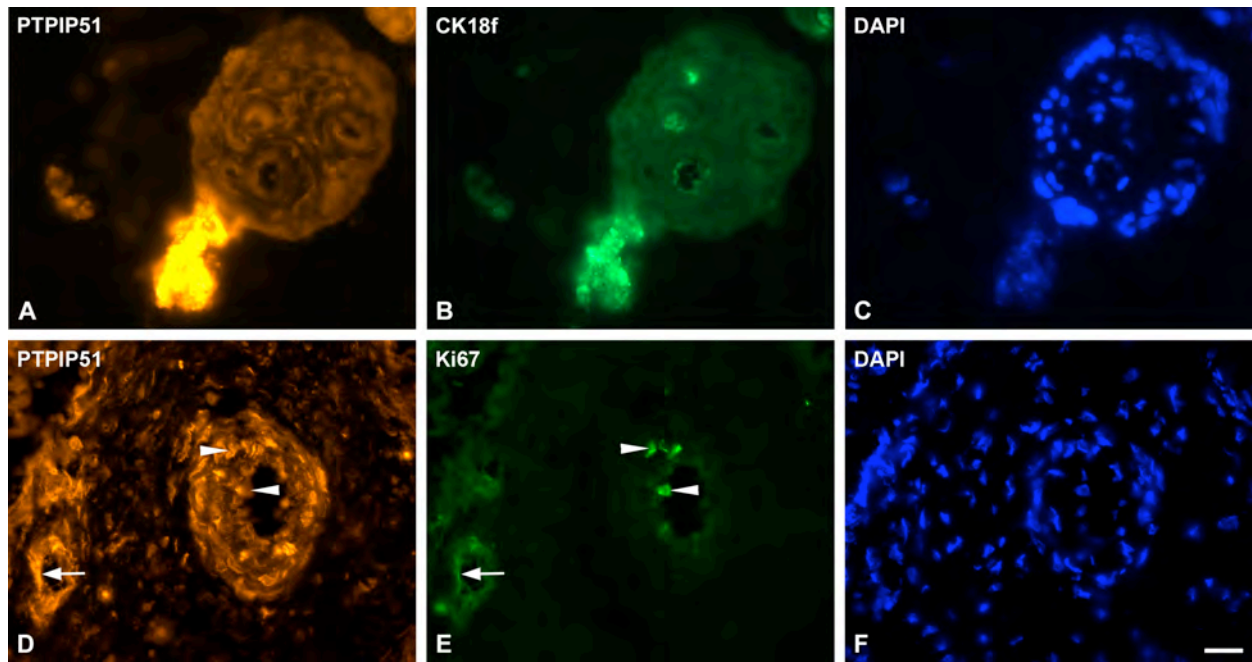


Abbildung 7: Doppelimmunfärbung mit PTPIP51, Ki67 und Zytokeratin 18f

(Balken: 20 µm)

- A) PTPIP51 Immunfärbung in der reifen Plazenta
- B) Zytokeratin 18f Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes
- D) PTPIP51 Immunfärbung in der reifen Plazenta
- E) Ki67 Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes
- F) DAPI Färbung des in D verwendeten Schnittes

Pfeil: Endothel, *Pfeilspitze*: glatte Muskelzelle

3.7 In vitro Interaktionspartner

Zusätzlich wurde die Lokalisation weiterer in vitro Interaktionspartner der PTPIP51, 14-3-3 β , c-Src und Raf-1, in der reifen humanen Plazenta näher betrachtet. Dies wurde mittels weiterer Immundoppelfärbungen des PTPIP51 Antigens und der Antigene der entsprechenden Interaktionspartner durchgeführt. Um eine zweifelsfreie Identifizierung der Lokalisation zu erhalten, wurden Parallelschnitte ebenfalls doppelmarkiert. Hierfür wurden Antikörper gegen zellspezifische Antigene in Kombination mit den Antikörpern gegen 14-3-3 β , c-Src und Raf-1 eingesetzt. Die

Identifikation von Endothelien erfolgte über die Verwendung von von Willebrand-Faktor, einem spezifischen Endothelzellmarker. Glatte Muskelzellen in den Wänden von Arterien, Venen bzw. Kapillaren sind durch die Verwendung von α -smooth muscle Aktin detektiert worden. Zur Identifizierung der Hofbauerzellen fanden CD14-Antikörper Verwendung, welche selektiv plazentaspezifische Makrophagen darstellten. Zytokeratin 7 diente als spezifischer Marker für Zytotrophoblasten, wie von Frank et al. (2000) für die humane Plazenta beschrieben worden war. Negativkontrollen wurden zu jeder Versuchreihe angefertigt.

3.7.1 14-3-3 β

Immundoppelfärbungen mit 14-3-3 β , ein wichtiges regulatorisches Protein in der Entstehung von Karzinomen, der Apoptose und des Zellzykluses, zeigen eine Kolokalisation mit PTIP51 in den Synzytiotrophoblasten und in den Hofbauer-Zellen (Abb. 8 A und B). Eine Koexpression von PTIP51 und 14-3-3 β liegt in den Endothelien der arteriellen und venösen Gefäße, sowie in den Kapillaren vor (Abb. 8 D und E). Auch in Granulozyten kommt es zu einer Koexpression beider Proteine (Abb. 8 G und H). Mittels Immundoppelfärbungen war es nicht möglich eine Kolokalisation der beiden Proteine in den Zytotrophoblasten, identifiziert mittels Zytokeratin 7 Antikörpern, der humanen Plazenta zu detektieren. Die Stromazellen zeigten wie auch die glatten Muskelzellen keine Reaktivität gegen den 14-3-3 β Antikörper (Abb. 8 A, B).

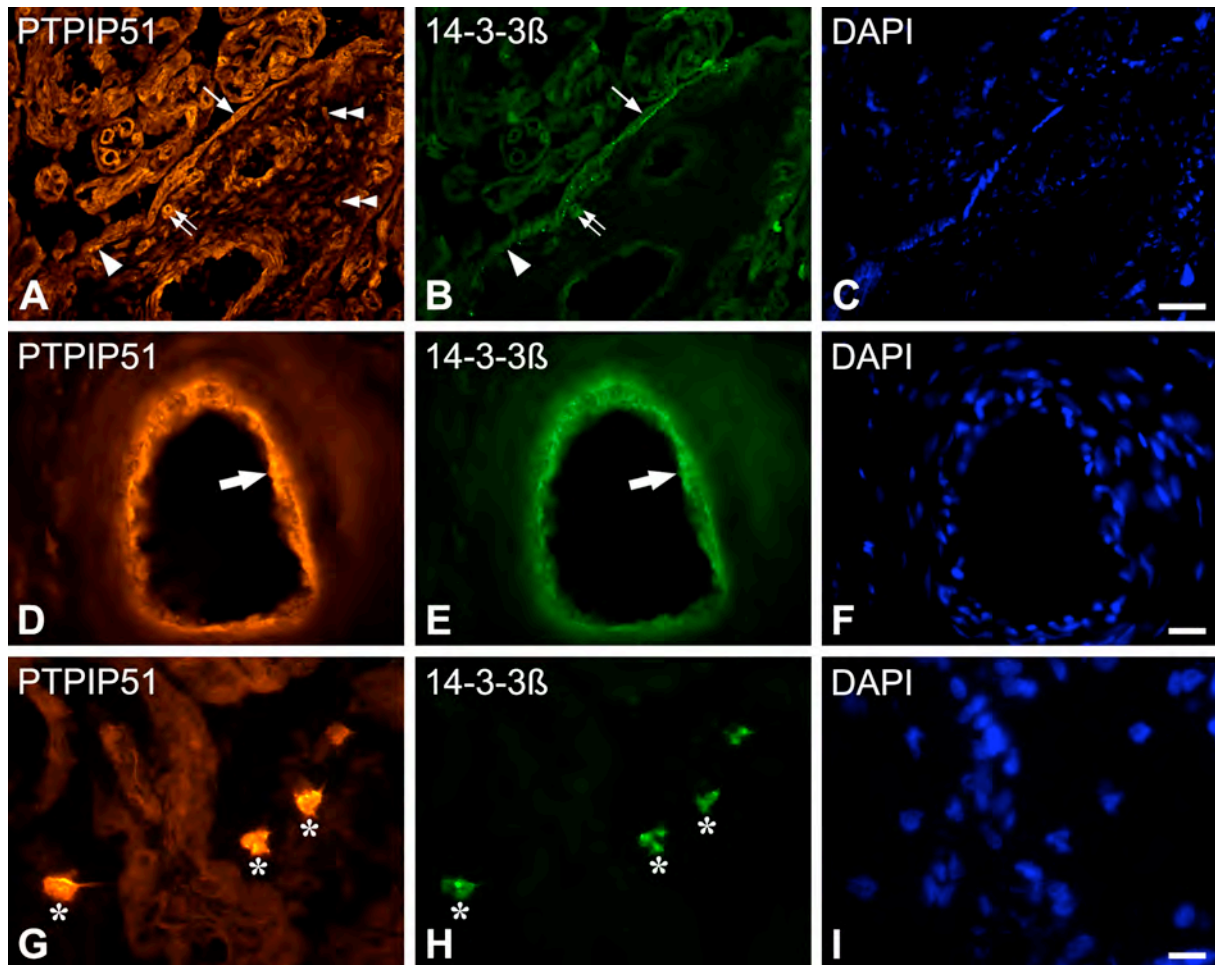


Abbildung 8: Doppelimmunfärbung mit PTPIP51 und 14-3-3β von der humanen Plazenta

- A) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- B) 14-3-3β Immunfärbung
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes , Balken: 50 μm
- D) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- E) 14-3-3β Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes von D
- F) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes , Balken: 20 μm
- G) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- H) 14-3-3β Immunfärbung des in G verwendeten Schnittes
- I) DAPI Färbung des in G verwendeten Schnittes, Balken: 20 μm

dünner Pfeil: Synzytiotrophoblast, *dicker Pfeil:* Endothel, *Doppelpfeil:* Hofbauerzelle, *Pfeilspitze:* Zytotrophoblast, *doppelte Pfeilspitze:* Stromazelle, *weißer Stern:* Granulozyten

3.7.2 c-Src

Doppelimmunfärbungen mit c-Src, einer Kinase mit Schlüsselfunktion in der intrazellulären Signaltransduktion und potentiell Protoonkogen, geben Hinweise auf eine mögliche in vivo Interaktion. Eine Kolokalisation des c-Src Proteins mit der PTPIP51 war in den Endothelien der venösen und arteriellen Gefäße als auch in den Kapillaren, in der Synzytiotrophoblastenschicht zu detektieren und eine partielle Kolokalisation zeigte sich in der glatten Muskulatur der Gefäßwände (Abb. 9 A, B, D und E). In den plazentaspezifischen Makrophagen lag ebenfalls eine Koexpression von PTPIP51 und c-Src vor (Abb. 9 G, H, K und L). Wie gezeigt in Abb. K und L ließ sich c-Src in mit CD14-Antikörper markierten Hofbauerzellen nachweisen. Sowohl die Stromazellen der Villi als auch die Zytotrophoblasten zeigten keine spezifische Reaktion gegen c-Src (Abb. A und B).

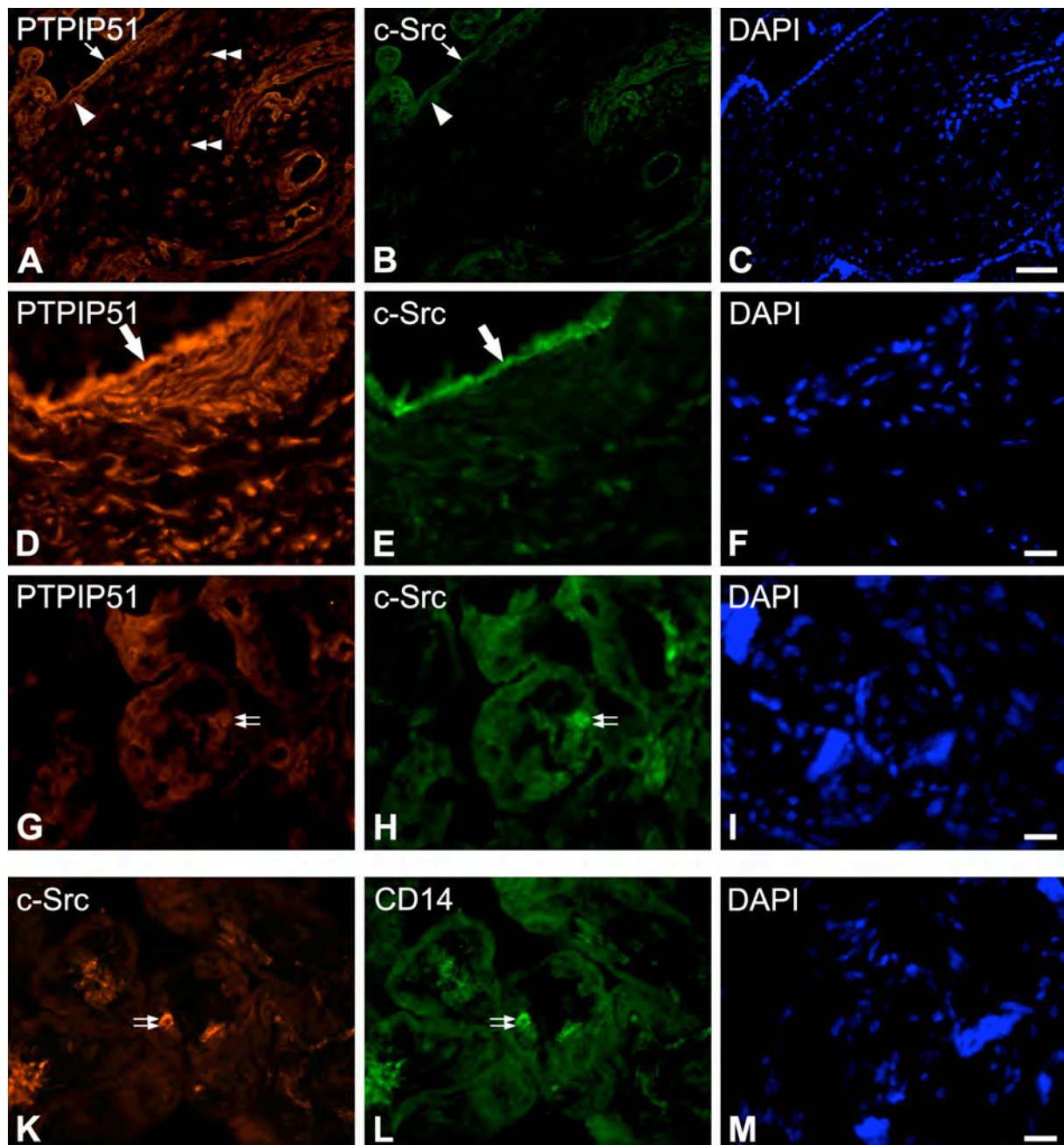


Abbildung 9: Doppelimmunfärbungen mit PTPIP51, c-Src und CD14 von der humanen Plazenta

- A) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- B) c-Src Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung von A, Balken: 50 μ m
- D) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
- E) c-Src Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes
- F) DAPI Färbung des in D verwendeten Schnittes, Balken: 20 μ m

- G) PTPIP51 Immunfärbung der reifen Plazenta
 - H) c-Src Immunfärbung des in G verwendeten Schnittes
 - I) DAPI Färbung des in G verwendeten Schnittes, Balken: 20 µm
 - K) c-Src Immunfärbung der reifen Plazenta
 - L) CD14 Immunfärbung des in K verwendeten Schnittes
 - M) DAPI Färbung des in K verwendeten Schnittes, Balken: 20 µm
- dünner Pfeil:* Synzytiotrophoblast, *dicker Pfeil:* Endothel, *Doppelpfeil:* Hofbauerzelle, *Pfeilspitze:* Zytotrophoblast, *doppelte Pfeilspitze:* Stromazelle

3.7.3 Raf-1

Eine Kolokalisation von Raf-1, welche eine wichtige Rolle im MAP-Kinase-Signalweg spielt, und PTPIP51 ist in den Endothelien und in den glatten Muskelzellen durch Doppelimmunfärbungen nachweisbar (Abb. 10 A und B). Die Hofbauerzellen wie die Synzytiotrophoblasten zeigten für Raf-1, wie auch schon für 14-3-3 β und c-Src gesehen, eine deutliche Kolokalisation mit PTPIP51 (Abb. 10 G, H, K und L). Sowohl die Stromazellen der Villi als auch die Zytotrophoblasten zeigten keine spezifische Reaktion gegen Raf-1 (Abb. 10 D und E).

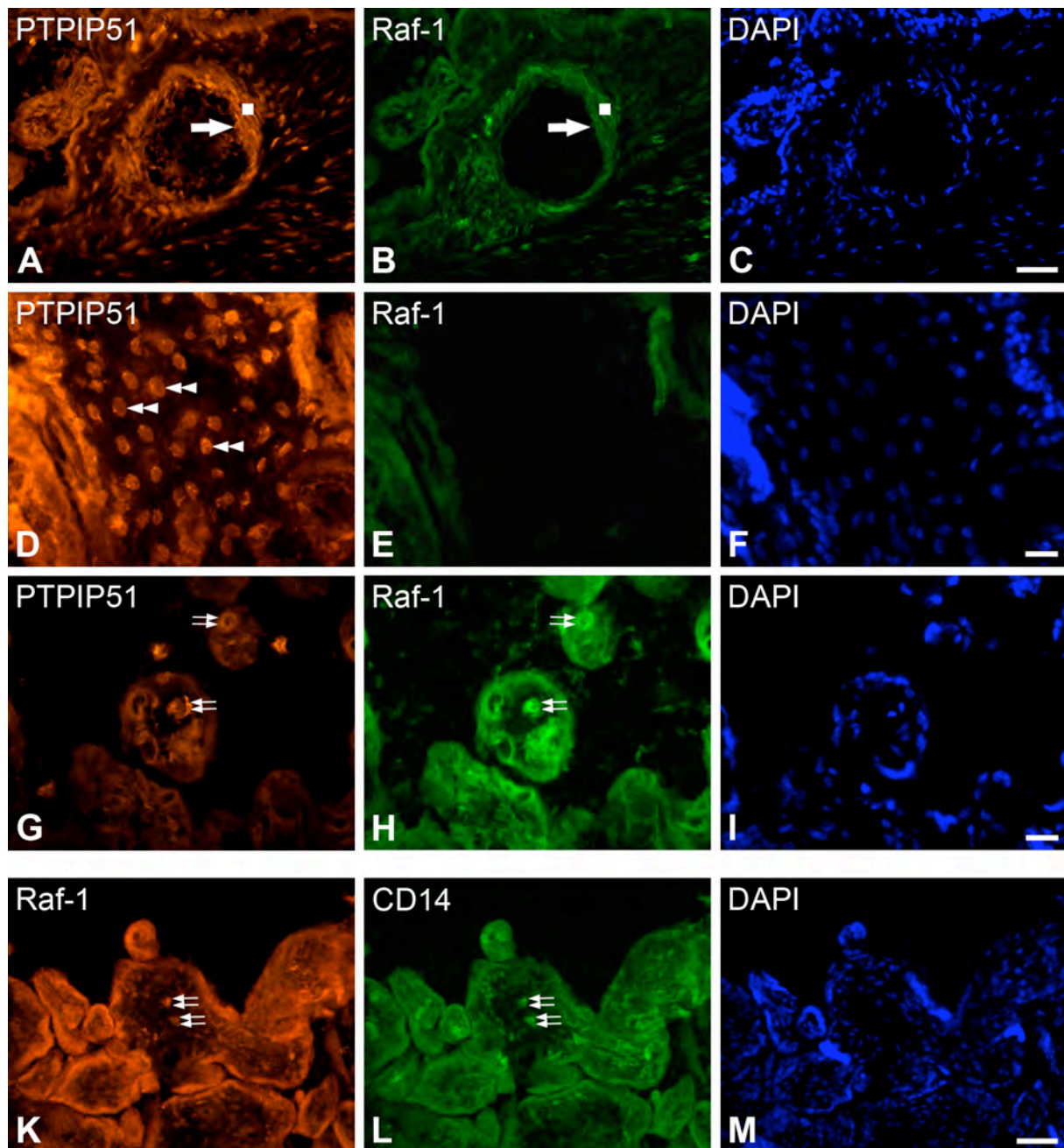


Abbildung 10: Doppelimmunfärbungen mit PTPIP51, Raf-1 und CD14 von der humanen Plazenta

- A) PTPIP51 Immunfärbung
- B) Raf-1 Immunfärbung des in A verwendeten Schnittes
- C) DAPI Färbung des in A verwendeten Schnittes, Balken 50 μm
- D) PTPIP51 Immunfärbung
- E) Raf-1 Immunfärbung des in D verwendeten Schnittes
- F) DAPI Färbung des in D verwendeten Schnittes, Balken 20 μm

- G) PTPIP51 Immunfärbung
 - H) Raf-1 Immunfärbung des in G verwendeten Schnittes
 - I) DAPI Färbung des in G verwendeten Schnittes, Balken 20 µm
 - K) Raf-1 Immunfärbung
 - L) CD14 Immunfärbung des in J verwendeten Schnittes J
 - M) DAPI Färbung des in J verwendeten Schnittes, Balken 50 µm
- dicker Pfeil: Endothel, Doppelpfeil: Hofbauerzelle, Viereck: glatte Muskelzellen,
doppelte Pfeilspitze: Stromazelle

Die hier nachgewiesenen Kolo­kalisat­ionen der PTPIP51 mit 14-3-3β, c-Src und Raf-1 in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Synzytiotrophoblasten und Hofbauer Zellen deuten auf mögliche in vivo Interaktionen mit dem PTPIP51 hin.

4 Diskussion

Diese Studie zeigt erstmalig die zellspezifische Expression von PTPN22 und seinen in vitro Interaktionspartnern PTPN22, 14-3-3, Raf-1 und Src in der humanen Plazenta. Die Untersuchungen erfolgten an Proben aus verschiedenen Schwangerschaftsabschnitten (Trimenon). Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des PTPN22 an einer Vielzahl von zellulären Abläufen hin, unter anderem ist es an der Apoptose und der Zelldifferenzierung beteiligt, die für die funktionelle Integrität der Synzytiotrophoblasten von entscheidender Bedeutung sind. Die oberflächliche, einschichtige Lage aus Synzytiotrophoblasten, die durch Fusion aus Trophoblasten entstanden ist, umgibt das Stroma der Villi und Zotten innerhalb der Plazenta und stellt die strukturelle und funktionelle Hauptkomponente der Plazenta dar. Diese einschichtige Epithelschicht erlaubt einen sehr engen Kontakt zwischen mütterlichem und kindlichem Blut und bildet eine semipermeable Membran, ohne dass es in der Regel zu einem Transfer von Blutzellen kommt. Eine Differenzierung der villösen Zytotrophoblasten, die aus zytotrophoblastischen Progenitorzellen entstehen, führt zu einer multinukleären Lage aus fusionierten Synzytiotrophoblasten (Lee et al. 2007). Dieser Vorgang ist durch Huppertz (Huppertz et al. 1998 und 2006, Black et al. 2004) und andere Arbeitsgruppen (Ka und Hunt 2003, Ho et al. 2004) minutiös erforscht worden.

Die Zytotrophoblasten nutzen die initialen Stadien der Apoptose zur Differenzierung und zur späteren Fusion mit den Synzytiotrophoblasten (Huppertz et al. 1999). Black und Mitarbeiter (2004) stützen dieses Konzept. Die Verschmelzung von Zytotrophoblasten zu Synzytiotrophoblasten erfordert eine exakte Regulierung des Apoptose-Signalweges. Diese Verschmelzung führt letztlich zu einer Degradation und zu der Formierung von „syncytial-knots“. Bei „syncytial-knots“ handelt es sich um (pre-)apoptotische Kernansammlungen, die, ausgehend von der Synzytiotrophoblastenoberfläche, in den intervillösen Raum vorgestülpt sind und als Trophoblastenfragmente in den intervillösen Raum ausgestoßen werden. Dort werden sie vom mütterlichen Blutkreislauf abtransportiert und an anderer Stelle phagozytiert (Huppertz und Kingdom 2004, Mayhew 2001). Diese morphologischen Charakteristika, die durch Apoptose entstehen, können in den Trophoblasten der Villi

von sich normal entwickelnden Plazenten beobachtet werden und stellen einen physiologischen Prozess dar (Mayhew et al. 1999, Smith et al. 1997 und 2000).

Die Trophoblasten als aktives Gewebe unterliegen einem kontinuierlichen Turnover und die Zellerneuerung ist durch einen genau instrumentierten Prozess von „tissue-remodeling“ unter Einbeziehung der Apoptose reguliert. Der Anteil an apoptotischen Trophoblasten nimmt im Schwangerschaftsverlauf zu (Smith et al. 1997 und 2000), was auf eine entwicklungsabhängige Regulation der Apoptose hindeutet. Interessanterweise zeigen diese Vorgänge einige Gemeinsamkeiten mit dem regulierten Turnover von epidermalen Keratinozyten. Wie Stenzinger und Mitarbeiter (2006) zeigten, ist das PTPIP51 in entsprechender Weise am regulierten Turnover der Keratinozyten beteiligt. Die Apoptose des Trophoblasten erfordert die Aktivierung der Caspase 8 und 3, sowie die Mitwirkung der Src-Kinasen und des JAK-STAT Transduktinsweges.

Die Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie werden während der Differenzierung der Trophoblasten unterschiedlich stark exprimiert. Mit fortschreitender Differenzierung kommt es zu einer zunehmenden mRNA Expression der c-Src-Kinase (Daoud et al. 2006). Interessanterweise exprimieren Stromazellen des Endometriums aktivierte c-Src-Kinase während der in vitro Dezidualisierung (Maruyama et al. 1999). Dies geht mit einer subzellulären Translokation vom perinukleolären zum zytoplasmatischen Kompartiment einher. Experimentelle Untersuchungen mit kultivierten Trophoblasten zeigen, dass mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) offenbar als Signalpartner bei der Differenzierung von Trophoblasten dienen (Daoud et al 2005). Die Expression von PTPIP51 ist sowohl in Zytotrophoblasten und auch in Synzytiotrophoblasten, die sich in Apoptose befinden, nachweisbar. Dass auch Zytotrophoblasten direkt in Apoptose übergehen können, wurde bereits von Kar und Kollegen (2007) beschrieben. Diese apoptotischen Zytotrophoblastzellen sind hoch reaktiv gegen den PTPIP51 Antikörper. Durch Immundoppelfärbungen von PTPIP51 und Zytokeratin 18f, einem spezifischen Marker für apoptotische Trophoblasten in der humanen Plazenta (Kadyrov et al. 2001) bzw. Caspase 3, konnten über eine Kolokalisation Zellen, welche sich in einem sehr frühen Stadium (Zytokeratin 18f) bzw. in einem Frühstadium (Caspase 3) der Apoptose befinden, nachgewiesen werden. Die Anzahl an Zellen, die eine Kolokalisation aufweisen, nimmt mit

fortschreiten der Gravidität stetig zu. Mit Hilfe eines TUNEL Assays war es zusätzlich möglich, im Spätstadium der Apoptose befindliche „syncytial-knots“ und eine kleine Population von apoptotischen Zytotrophoblasten zu identifizieren. Die in diesen Fällen exprimierte Form entspricht sehr wahrscheinlich der „full-length“ Form des Proteins PTPIP51, die über eine mitochondriale Target Sequenz verfügt. Diese Isoform kann die Apoptose einleiten, da Überexpression des PTPIP51 in HEK293T Zellen zu Apoptose der Zellen führte (Lv et al. 2006).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist PTPIP51 offensichtlich auch ein Signalpartner in sehr frühen (Zytokeratin 18f) bis frühen (Caspase 3) Stadien der Apoptose, wie die Doppellokalisationen dieser Proteine mit PTPIP51 in „syncytial-knots“, Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten zeigten. Die Apoptose stellt einen wesentlichen Regulationsmechanismus in der Plazenta dar, bei dem mit großer Wahrscheinlichkeit die Expression von PTPIP51 eine entscheidende regulatorische Rolle spielt.

Die Aktivität von PTPIP51 wurde auch in Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten von nicht apoptotischen Zellen nachgewiesen. Dies bedeutet, dass PTPIP51 nicht ausschließlich nur für die Einleitung und Regulation der Apoptose verantwortlich ist, sondern auch in zelluläre Differenzierungsvorgänge involviert ist. Zusätzlich gelang auch ein Nachweis von PTPIP51 Protein mittels Doppelimmunreaktion von PTPIP51 und Ki67 in proliferierenden glatten Muskel- und Endothelzellen, was auf eine Beteiligung an proliferativen Prozessen hinweist. So führt eine Aktivierung des VEGFR-2 über die PKC-Raf-MEK-MAPK Kaskade (Kerbel 2008) bzw. über den Ras-MAPK-Signalweg (FGFR) zu proliferativen Prozessen in der Plazenta. Hierbei sind Interaktionen der PTPIP51 einschließlich ihrer in vitro Interaktionspartner PTPIP1B, 14-3-3, Raf-1 und Src als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Diese Vielfalt an Ergebnissen erklärt sich mit den möglichen Isoformen bzw. Splicing-Varianten des Proteins, welche in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Stenzinger et al. 2005). Ein Hinweis auf verschiedene Funktionen des PTPIP51 in der Plazenta geben auch die unterschiedlichen Molekulargewichte (von etwa 52 kDa, 45 kDa, und 28 kDa), die mittels eines Immunoblottings ermittelt wurden. Die Initiationsstellen innerhalb des *Ptpip51* Genes sind bekannt. Somit ergeben sich

theoretische Proteingewichte von 52 kDa, 45 kDa, 38 kDa und 30 kDa (Pfeiffer 2006), welche in etwa den im Immunoblot gefundenen Werten der PTPIP51 Isoformen entsprechen.

Die full length Form (52 kDa) ist für die Apoptose verantwortlich, wobei die N-terminale Sequenz für den Ablauf der Apoptose unabdingbar ist. Da diese Sequenz beim Splicen verloren gehen kann, kommt es zur Expression von PTPIP51 Formen, welche andere zelluläre Funktionen regulieren.

PTPIP51 war ebenfalls in plazentaspezifischen Makrophagen nachzuweisen. Auch hier kann von einer spezifischen Funktion des PTPIP51 in diesen Makrophagen (Hofbauer-Zellen) ausgegangen werden. Stenzinger und Kollegen (2007) wiesen die Expression des PTPIP51 in sessilen Lebermakrophagen, den Kupfferzellen, nach. Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktionspartner des PTPIP51, die Kinasen der Src-Familie (Korade-Mirnic und Corey 2000, Berton et al. 2005, Pixley und Stanley 2004), als auch die Raf-1 (Hamelton et al. 1995) und die MAP-Kinase (Hardy et al. 2009) in die Signaltransduktionswege der Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen involviert sind, erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass PTPIP51 in den plazentaspezifischen Hofbauerzellen in diese Signaltransduktionswege involviert ist.

PTPIP51 wird in den Endothelien der arteriellen und venösen Gefäße, als auch in Kapillaren der humanen Plazenta, unabhängig von deren Entwicklungsstand, exprimiert. Überdies sind die glatten Muskelzellen der Arterienwand, PTPIP51 positiv. Eine kontinuierliche Expression von PTPIP51 findet sich im Verlauf der gesamten Schwangerschaft in größeren Gefäßen und Kapillaren. Diese sind durch ein, die gesamte Schwangerschaft betreffendes, kontinuierliches Wachstum gekennzeichnet. Zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionalität während dieser Wachstumsprozesse könnte PTPIP51 eine bedeutende Rolle spielen. Infolgedessen erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass PTPIP51 an Signaltransduktionskaskaden zur Steuerung der Angiogenese und des Gefäß-Remodelling entscheidend beteiligt ist. Die Aktivierung eines VEGF2-Rezeptors (VEGFR-2) führt über die PKC-Raf-MEK-MAPK Kaskade (Kerbel 2008) bzw. über den Ras-MAPK-Signalweg bei der Bindung eines Liganden an den FGFR zu einer Proliferation von Endothelzellen. Hier sind Interaktionen mit PTPIP51 als sehr wahrscheinlich anzusehen. Red-Horse und

Kollegen (2006) berichteten, dass humane Zytotrophoblasten imstande sind die Apoptose in arteriellen glatten Muskelzellen und Endothelzellen einzuleiten. PTPIP51 wird in arteriellen Gefäßen der plazentalen Villi über alle Stadien der Schwangerschaft hinweg exprimiert und kann so auch an diesem Prozess mitwirken. Da PTPIP51 nicht nur in proliferierenden Endothelzellen exprimiert wird, sondern auch in proliferierenden Zytotrophoblasten bestätigen diese Beobachtungen die Bedeutung der PTPIP51 bei der Mitose und dem Zellzyklus. Die Angiogenese und das sich anschließende Remodelling der Gefäße spielt im allgemeinen eine kritische Rolle in der Entwicklung der Plazenta und des Fötus. In diesem komplizierten Prozess kommt eine Vielzahl von anti- und pro-angiogenetischen Faktoren zum Tragen. Für viele durch Wachstumsfaktoren induzierte Signaltransduktionskaskaden, die zur Endothelzellaktivierung und zur Proliferation führen, ist die Tyrosin-Phosphorylierung ein essentieller Bestandteil. Endothelzellaktivierung und Proliferation sind obligatorisch für die Formierung des Kapillarplexuses, sowie für die Gefäßaussprossung (Carmeliet 2005, Red-Horse et al. 2006). Interessanterweise wird VEGF kontinuierlich während der Gestation von unterschiedlichen Zelltypen der Plazenta gebildet. Anfangs erfolgt die Produktion durch die Zytotrophoblasten der Villi, während bei allen weiteren Schritten der Angiogenese die Zytotrophoblasten, die Hofbauerzellen und die Fibroblasten die Produktion des VEGFs übernehmen (Charnock-Jones et al. 2004, Demir et al. 2007). Wie durch Reynolds und Redmer (2001) gezeigt wurde, sind VEGF und FGF die bestimmenden Wachstumsfaktoren, die die plazentare Angiogenese und Vaskulogenese regulieren. VEGF wiederum aktiviert Raf-1 via Src Kinase, woraus ein Schutz vor verschiedenen apoptotischen Stimuli resultiert (Alavi et al. 2003). Die Bindung eines der Mitglieder aus der VEGF-Familie an einen VEGFR-2 führt zur Proliferation von Endothelzellen. Diese Proliferation wird über die PKC-Raf-MEK-MAPK Kaskade vermittelt (Kerbel 2008). Der Ras-MAPK-Signalweg ist ebenfalls über die Bindung eines Liganden an den FGFR aktivierbar. Dies könnte über PTPIP51 durch einen 14-3-3 abhängigen Vorgang vermittelt werden. Die durch VEGF-2 induzierte Zellmigration vollzieht sich durch eine „downstream“ Aktivierung der Src-Kinase, welche wiederum PTPIP51 phosphorylieren kann.

Interaktionspartner des PTPIP51 in der Plazenta:

Obwohl die Erstbeschreibung der PTP1B schon vor 20 Jahren erfolgte (Charbonneau et al. 1989), gibt es bis zum heutigen Tag noch keine Untersuchung der morphologischen Lokalisation der PTP1B in der humanen Plazenta. Die PTP1B stellt einen Prototyp unter den Protein-Tyrosin-Phosphatasen dar, der sich schnell als ein wichtiger Signalpartner für die Regulierung des Immunsystems, des Zellzykluses, der Apoptose, und Zelldifferenzierung, sowie in der Entstehung von Karzinomen und Stoffwechselerkrankungen erwies (Tonks 2003, Dubé und Tremblay 2005, Ostman et al. 2006, Gonzáles-Rodriguez et al. 2007, Koyama et al. 2006).

Eine Expression der PTP1B war in allen Abschnitten der Schwangerschaft in der Mehrheit der Zytotrophoblasten und in einer etwas abgeschwächten Form in den Synzytiotrophoblasten nachweisbar. Interessanterweise sind Src-Kinasen, Interaktionspartner der PTP1B (Roskoski 2005, Julien et al. 2007), auch in die Differenzierung der Trophoblasten involviert (Daud et al. 2006). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass PTPIP51, das *in vitro* an Y176 durch c-Src- und v-Src-Kinasen Thyrosin-phosphoryliert wird (Schreiner, pers. Mitteilung), mit diesen in Interaktion tritt und dadurch die Differenzierung der Trophoblasten fördert. Die Zytokin vermittelte Signaltransduktion, die auch den JAK-STAT-Pfad aktiviert, ist ebenso wichtig für die Differenzierung der Trophoblasten. Die *Ptpip51* Transkription in der Rattenretina wird durch den Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), einem Mitglied der Interleukin-6 Familie, reguliert (Roger et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass die Transkription des PTPIP51-Gens in der humanen Plazenta ebenfalls von einer zytokinen Stimulation abhängig ist.

In der reifen Plazenta ist eine Kolokalisation der PTPIP51 mit 14-3-3 β , c-Src und Raf-1 in der oberflächlichen Synzytiotrophoblastenschicht, in den plazentaspezifischen Makrophagen und den Endothelien der Gefäßwände zu detektieren. Die PTP1B hingegen zeigt in diesem Stadium lediglich eine Koexpression mit PTPIP51 in den Synzytiotrophoblasten. Die Muscularis der Gefäße weist mit Raf-1, als auch mit c-Src, hier jedoch nur partiell, eine Kolokalisation mit dem PTPIP51 auf. Zahlreiche Kolokalisationen von PTPIP51 mit seinen *in vitro*

Interaktionspartnern, weisen auf eine bedeutende *in vivo* Rolle des PTPIP51 an der Vermittlung und Interaktionen von Signaltransduktionskaskaden hin.

Da auch die Expression des PTPIP51, sowohl an Intensität als auch der Lokalisation, im Verlauf der Schwangerschaft stark variiert, ist davon auszugehen, dass PTPIP51, über die Beteiligung an unterschiedlichsten Regulationsprozessen, von zentraler Bedeutung im Verlauf der gesamten Schwangerschaft für den Entwicklungsverlauf der Plazenta ist.

5 Zusammenfassung

Beim Protein-Tyrosin-Phosphatase-Interagierendes-Protein 51 (PTPIP51) handelt es sich um ein evolutionär konserviertes Protein, welches in vielen Organen und Geweben unterschiedlichster Spezies exprimiert wird. Bei vielen malignen Erkrankungen und in einigen Zelllinien ist PTPIP51 ebenfalls nachweisbar. Hierbei war auffällig, dass PTPIP51 in all jenen Geweben verstärkt exprimiert wurde, bei denen eine präzise Regulation von Proliferation, Differenzierung oder Apoptose erforderlich ist. Dies lässt die begründete Vermutung zu, dass PTPIP51 in diese komplexen Vorgänge involviert ist.

Bei dieser Untersuchung wurde PTPIP51 in vivo im Verlauf der plazentaren Entwicklung während der Schwangerschaft untersucht, da im Laufe der Schwangerschaft ein balanciertes Zusammenspiel zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose für die Entwicklung des Fötus und der Plazenta von zentraler Bedeutung ist. Hierbei wurde die histologische Lokalisation der PTPIP51 und ihrer Interaktionspartner PTP1B, 14-3-3 β , c-Src und Raf-1 näher betrachtet. Die Studien erfolgten für PTPIP51 und PTP1B an Plazenten des ersten, zweiten und dritten Trimesters und für die anderen Interaktionspartner jeweils an reifen Plazenten.

PTPIP51-mRNA wurde in der Plazenta über eine RT-PCR in allen Abschnitten der Schwangerschaft nachgewiesen. Der Proteinnachweis in der reifen Plazenta mittels Immunoblotting zeigte drei Isoformen des PTPIP51, welche mit den theoretisch berechneten Molekulargewichten übereinstimmten. PTPIP51 Protein und mRNA konnte im Verlauf der gesamten Entwicklung durch Immunhistochemie und in situ Hybridisierung in allen Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu traf dies für PTP1B nur auf die Synzytiotrophoblasten zu. In allen Schwangerschaftsabschnitten beschränkte sich die PTPIP51 Antikörperreaktion in den Gefäßen auf die glatten Muskelzellen der Media und das Endothel. Zusätzlich zeigten plazentaspezifische Makrophagen eine kontinuierliche Immunreaktivität gegen PTPIP51. Über die Verwendung von verschiedenen Apoptosemarkern, wurde der Nachweis erbracht, dass PTPIP51 sowohl in Zellen die sich im Frühstadium der Apoptose als auch in Zellen welche sich im Spätstadium der

Apoptose befinden, exprimiert wird. Apoptotische Synzytiotrophoblasten, sowie eine geringe Zahl von apoptotischen Zytotrophoblasten konnten über den gesamten untersuchten Zeitraum beobachtet werden. PTPIP51 hoch immunreaktive Endothel- und glatte Muskelzellen wurden über Ki67 als proliferierende Zellen identifiziert. In der reifen Plazenta ist eine Kolokalisation der PTPIP51 mit 14-3-3 β , c-Src und Raf-1 in der oberflächlichen Synzytiotrophoblastenschicht, in den plazentaspezifischen Makrophagen und den Endothelien der Gefäßwände zu detektieren. Die Muscularis der Gefäße zeigt gegen den Raf-1-Antikörper, als auch gegen c-Src, hier jedoch nur partiell, eine Kolokalisation mit PTPIP51. Aufgrund von zahlreichen Kolokalisationen von PTPIP51 mit den *in vitro* Interaktionspartnern, ist davon auszugehen, dass PTPIP51 einen entscheidenden Einfluss auf die gesamte Entwicklung der Plazenta nimmt und in zahlreiche Signaltransduktionskaskaden involviert ist. PTPIP51 hat offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Apoptose von Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Darüber hinaus ist PTPIP51 sehr wahrscheinlich als ein wichtiger Signalpartner bei der Angiogenese und dem Gefäßremodeling anzusehen.

6 Summary

The protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) is an evolutionary conserved protein, which is expressed in many viscera and tissues of diverse species. The PTPIP51 is also detectable in many malignant cancers, as well as in all cell lines investigated up to now. It is noteworthy, that PTPIP51 is expressed with increasing concentration in all tissues undergoing rapid cell turnover which needs an exact regulation of proliferation, differentiation or apoptosis processes. This leads to the hypothesis, PTPIP51 being involved in the regulation of these complicated processes.

This study examines PTPIP51 expression *in vivo* in the course of placental development during pregnancy, as placental development needs a balanced teamwork between proliferation, differentiation and apoptosis to guarantee optimal development of the foetus. Thus, the histologic localisation of PTPIP51 and its interaction partners PTP1B, 14-3-3 β , c-Src and Raf was thoroughly investigated. PTPIP51 and PTP1B expression was investigated in placenta of the first, second and third trimester, whereas the interaction partners were studied only in term placenta.

PTPIP51-mRNA expression in placenta was analyzed by RT-PCR in all stadiums of pregnancy. By immunoblotting, three kinds of PTPIP51 isoforms were detected, which corresponded the theoretically calculated molecular weights. PTPIP51 protein and mRNA could be shown in all stages of placental development by immunohistochemistry and in situ hybridisation in all syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells. In contrast to this findings PTP1B is only expressed in syncytiotrophoblasts. PTPIP51 antibody reaction was found in all stages of pregnancy in blood vessels, where it was restricted to the smooth muscle cells of the media and the endothelium. In addition placental specific macrophages (Hofbauer-cells) showed a continuous immunoreactivity against PTPIP51. By the use of different markers for apoptosis, it was evidenced, that PTPIP51 is expressed in cells in the early stage of the apoptosis as well as in cells which are in the late stage of apoptosis. Apoptotic syncytiotrophoblasts, as well as a low number of apoptotic cytotrophoblasts could be observed during all investigated stages. PTPIP51 highly immunoreactive endothelial- and smooth muscle cells were identified by Ki67 as

proliferative cells. In term placenta a colocalisation of PTPIP51 with 14-3-3 β , c-Src and Raf-1 could be discovered within the superficial syncytiotrophoblast layer, in the placental specific macrophages and the endothelial tissue of the vascular walls. The muscularis of the vessels expressed Raf-1, as well as c-Src, but was only in part colocalised with the PTPIP51. Basis of numerous colocalisations of PTPIP51 and its in vitro interacting partners, it seems to be likely, that PTPIP51 is implicated in all stages of placental development by involvement in numerous signaling pathways. Probably, PTPIP51 has a determining effect on the differentiation and apoptosis of syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells. In addition, PTPIP51 is likely to be an important signal partner for angiogenesis and remodelling of the vessels.

7 Literaturverzeichnis

Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A, Zemlickova E (2002) Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. **Biochem Soc Trans** 30:351-360

Akasaki Y, Liu G, Matundan HH, Ng H, Yuan X, Zeng Z, Black KL, Yu JS (2006) A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, troglitazone, facilitates caspase-8 and -9 activities by increasing the enzymatic activity of protein-tyrosine phosphatase-1B on human glioma cells. **J Biol Chem** 281:6165-6174

Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell** 117:699-711

Barford D (1999) Colworth Medal Lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. **Biochem Soc Trans** 27:751-766

Barnekow A, Gessler M (1986) Activation of the pp60c-src kinase during differentiation of monomyelocytic cells in vitro. **EMBO J** 5:701-705

Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ (2000) Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. **J Biol Chem** 275:41439-41446

Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. **J Cell Biol** 156:817-828

Bürklen T (2001) Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase und möglichen Interaktionspartnern;Diplomarbeit, **Universität Konstanz**

- Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, Ramponi G (1998) The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. **J Biol Chem** 273:32554-32560
- Charbonneau H, Tonks NK, Kumar S, Diltz CD, Harrylock M, Cool DE, Krebs EG, Fischer EH, Walsh KA (1989) Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86:5252-5256
- Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003) Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cell Signal** 15:463-469
- Cirri P, Chiarugi P, Taddei L, Raugei G, Camici G, Manao G, Ramponi G (1998) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. **J Biol Chem** 273:32522-32527
- Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. **Trends Biochem Sci** 25:596-601
- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. **Mol Cell** 6:41-51
- Dewang PM, Hsu NM, Peng SZ, Li WR (2005) Protein tyrosine phosphatases and their inhibitors. **Curr Med Chem** 12:1-22
- Dougherty MK, Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. **J Cell Sci** 117:1875-1884
- Dube N, Tremblay ML (2005) Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. **Biochim Biophys Acta** 1754:108-117

Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M (2005) Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. **J Cell Biol** 168:955-964

Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT (1994) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. **Nature** 371:612-614

Ford JC, al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Carr AM (1994) 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. **Science** 265:533-535

Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG (1993) Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. **EMBO J** 12:4843-4856

Frank HG, Genbacev O, Blaschitz A, Chen CP, Clarson L, Evain-Brion D, Gardner L, Malek A, Morrish D, Loke YW, Tarrade A (2000) Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. **Placenta** 21 Suppl A:S120-122

Freiss G, Vignon F (2004) Protein tyrosine phosphatases and breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 52:9-17

Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 40:617-647

Gee CE, Griffin J, Sastre L, Miller LJ, Springer TA, Piwnica-Worms H, Roberts TM (1986) Differentiation of myeloid cells is accompanied by increased levels of pp60c-src protein and kinase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 83:5131-5135

Guan KL, Dixon JE (1991) Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. **J Biol Chem** 266:17026-17030

Gulati P, Markova B, Gottlicher M, Bohmer FD, Herrlich PA (2004) UVA inactivates protein tyrosine phosphatases by calpain-mediated degradation. **EMBO Rep** 5:812-817

Halle M, Tremblay ML, Meng TC (2007) Protein tyrosine phosphatases: emerging regulators of apoptosis. **Cell Cycle** 6:2773-2781

Hardy PO, Diallo TO, Matte C, Descoteaux A (2009) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAPK in regulation of protein kinase C- α activation in interferon- γ -stimulated macrophages. **Immunology** „Accepted Article“

Hauri HP, Bucher K (1986) Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. **Anal Biochem** 159:386-389

Heinonen KM, Dube N, Bourdeau A, Lapp WS, Tremblay ML (2006) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:2776-2781

Hooft van Huijsduijnen R, Sauer WH, Bombrun A, Swinnen D (2004) Prospects for inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B as antidiabetic drugs. **J Med Chem** 47:4142-4146

Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell** 80:225-236

Hunter T, Sefton BM (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 77:1311-1315

Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC (2006) Apoptosis and its role in the trophoblast. **Am J Obstet Gynecol** 195:29-39

Huppertz B, Kingdom JC (2004) Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. **J Soc Gynecol Investig** 11:353-362

Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R, Yeatman TJ (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. **Nat Genet** 21:187-190

Jia Z, Barford D, Flint AJ, Tonks NK (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. **Science** 268:1754-1758

Kar M, Ghosh D, Sengupta J (2007) Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. **Hum Reprod** 22:2814-2823

Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. **Mol Cell Biol** 20:5479-5489

Koch P, Stenzinger A, Viard M, Marker D, Mayser P, Nilles M, Schreiner D, Steger K, Wimmer M (2007) The novel protein PTPIP51 is expressed in human keratinocyte carcinomas and their surrounding stroma. **J Cell Mol Med** [Epub ahead of print]

Koch P, Stenzinger A, Viard M, Marker D, Mayser P, Nilles M, Schreiner D, Steger K, Wimmer M (2008) The novel protein PTPIP51 is expressed in human keratinocyte carcinomas and their surrounding stroma. **J Cell Mol Med** 12:2083-2095

Lewis FA, Wells M (1992) Detection of virus in infected human tissue by in situ hybridisation; in: Wilkinson, D.G. (ed.); In situ hybridisation, a practical approach; **Oxford University Press**, Oxford, U.K.; pp121-135

Li HW, Tsao SW, Cheung AN (2002) Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. **Placenta** 23:20-31

Liu F, Sells MA, Chernoff J (1998) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. **Curr Biol** 8:173-176

Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast BB, Vogelmann R, Luhrs H, Friess H, Buchler MW, Adler G (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun** 243:503-508

Lv BF, Yu CF, Chen YY, Lu Y, Guo JH, Song QS, Ma DL, Shi TP, Wang L (2006) Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) is a novel mitochondria protein with an N-terminal mitochondrial targeting sequence and induces apoptosis. **Apoptosis** 11:1489-1501

Maerker D, Stenzinger A, Schreiner D, Tag C, Wimmer M (2008) Expression of PTPIP51 during mouse eye development. **Histochem Cell Biol** 129:345-356

Masters SC, Fu H (2001) 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. **J Biol Chem** 276:45193-45200

Mayhew TM (2001) Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. **Histol Histopathol** 16:1213-1224

Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ (1999) Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). **Placenta** 20:407-422

Mazurenko NN, Kogan EA, Zborovskaya IB, Kissel'ov FL (1992) Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. **Eur J Cancer** 28:372-377

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 51 Pt 1:263-273

Muslin AJ, Xing H (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. **Cell Signal** 12:703-709

Mustelin T, Coggeshall KM, Altman A (1989) Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56lck by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86:6302-6306

Muthuswamy SK, Muller WJ (1994) Activation of the Src family of tyrosine kinases in mammary tumorigenesis. **Adv Cancer Res** 64:111-123

Nada S, Yagi T, Takeda H, Tokunaga T, Nakagawa H, Ikawa Y, Okada M, Aizawa S (1993) Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. **Cell** 73:1125-1135

Neel BG, Tonks NK (1997) Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. **Curr Opin Cell Biol** 9:193-204

Nickoloff BJ, Denning M (2001) Life and death signaling in epidermis: following a planned cell death pathway involving a trail that does not lead to skin cancer. **J Invest Dermatol** 117:1-2

Nufer O, Hauri HP (2003) ER export: call 14-3-3. **Curr Biol** 13:R391-393

Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD (2006) Protein-tyrosine phosphatases and cancer. **Nat Rev Cancer** 6:307-320

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T,

Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Ohara O, Isogai T, Sugano S (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. **Nat Genet** 36:40-45

Ouellet M, Barbeau B, Tremblay MJ (2003) Protein tyrosyl phosphatases in T cell activation: implication for human immunodeficiency virus transcriptional activity. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 73:69-105

Pfeiffer T (2006) Regulierte Expression von PTPIP 51 in der Epidermis und den Hautanhangsgebilden; Dissertation, **Universität Gießen**

Porsche A (2001) Identifikation von Interaktionspartnern der T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase durch das Lex-A Two Hybrid System. Thesis (Ph.D.), **Universität Konstanz, 2001, (UFO Publishers, Allensbach, Vol. 414)**

Qu CK (2002) Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. **Biochim Biophys Acta** 1592:297-301

Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P (2002) Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. **Cell Mol Life Sci** 59:941-949

- Roger J, Goureau O, Sahel JA, Guillonneau X (2007) Use of suppression subtractive hybridization to identify genes regulated by ciliary neurotrophic factor in postnatal retinal explants. **Mol Vis** 13:206-219
- Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? **J Mol Evol** 51:446-458
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239:487-491
- Sell SM, Reese D (1999) Insulin-inducible changes in the relative ratio of PTP1B splice variants. **Mol Genet Metab** 66:189-192
- Shifrin VI, Neel BG (1993) Growth factor-inducible alternative splicing of nontransmembrane phosphotyrosine phosphatase PTP-1B pre-mRNA. **J Biol Chem** 268:25376-25384
- Shih Ie M (2007) Gestational trophoblastic neoplasia--pathogenesis and potential therapeutic targets. **Lancet Oncol** 8:642-650
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM (1997) Placental apoptosis in normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 177:57-65
- Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN (2000) Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. **Am J Obstet Gynecol** 183:697-699
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA (2004) JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. **Leukemia** 18:189-218

Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M (1998) Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. **Mol Hum Reprod** 4:939-945

Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M (2000) Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. **Mol Hum Reprod** 6:219-225

Stenzinger A, Kajosch T, Tag C, Porsche A, Welte I, Hofer HW, Steger K, Wimmer M (2005) The novel protein PTPIP51 exhibits tissue- and cell-specific expression. **Histochem Cell Biol** 123:19-28

Stenzinger A, Schreiner D, Pfeiffer T, Tag C, Hofer HW, Wimmer M (2006) Epidermal growth factor-, transforming growth factor-beta-, retinoic acid- and 1,25-dihydroxyvitamin D3-regulated expression of the novel protein PTPIP51 in keratinocytes. **Cells Tissues Organs** 184:76-87

Stenzinger A, Schreiner D, Tag C, Wimmer M (2007) Expression of the novel protein PTPIP51 in rat liver: an immunohistochemical study. **Histochem Cell Biol** 128:77-84

Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR (1990) Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. **Oncogene** 5:345-351

Summy JM, Gallick GE (2003) Src family kinases in tumor progression and metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 22:337-358

Superti-Furga G (1995) Regulation of the Src protein tyrosine kinase. **FEBS Lett** 369:62-66

Thomas SM, Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. **Annu Rev Cell Dev Biol** 13:513-609

Tonks NK, Cicirelli MF, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH (1990) Effect of microinjection of a low-Mr human placenta protein tyrosine phosphatase on induction of meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. **Mol Cell Biol** 10:458-463

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76:4350-4354

van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays** 23:936-946

Verbeek BS, Vroom TM, Adriaansen-Slot SS, Ottenhoff-Kalff AE, Geertzema JG, Hennipman A, Rijksen G (1996) c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. **J Pathol** 180:383-388

Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2004) Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. **Science** 304:1164-1166

Welte I (2000) Untersuchungen und Struktur des potentiell mit der T-Zell-Protein-Tyrosin-Phosphatase interagierenden Proteins P30, Diplomarbeit, **Universität Konstanz**

Wiener JR, Kerns BJ, Harvey EL, Conaway MR, Iglehart JD, Berchuck A, Bast RC, Jr. (1994) Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. **J Natl Cancer Inst** 86:372-378

Wiener JR, Nakano K, Kruzelock RP, Bucana CD, Bast RC, Jr., Gallick GE (1999) Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model. **Clin Cancer Res** 5:2164-2170

Xing H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ (2000) 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. **EMBO J** 19:349-358

Xu G, Arregui C, Lilien J, Balsamo J (2002) PTP1B modulates the association of beta-catenin with N-cadherin through binding to an adjacent and partially overlapping target site. **J Biol Chem** 277:49989-49997

Yaffe MB (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Lett** 513:53-57

Yuvaniyama J, Denu JM, Dixon JE, Saper MA (1996) Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. **Science** 272:1328-1331

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). **Cell** 87:619-628

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25 Dihydroxyvitamin D ₃
Abb.	Abbildung
Akt-1	apoptosis signal regulated kinase-1
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BAD	Bcl2-antagonist of cell death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
Bcl-X _L	Basal cell lymphoma-extra large protein
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
CA	Karzinom
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD14	Cluster of Differentiation 14
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Chk	c-terminal Src kinase homologous kinase
CK-7	Zytokeratin Peptid 7
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CSF-1/R	colony stimulating factor 1/receptor
Csk	c-Src Tyrosine-Kinase
cRNA	komplementäre Ribonucleinsäure
c-Src	structurally related cellular variant of v-Src
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid-Methanol
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC Wasser	Diethylpyrocarbonate Wasser
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat

DIG	Digoxigenin
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
DSPs	dualspezifische Phosphatasen
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	desoxy Uridintriphosphat
EGF	epidermal growth factor
ER	endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
HaCaT	humane Keratinocyten
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
IL	Interleukine
JAK	Janus Kinase
Kb	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
LMW	low molecular weight
M	Marker
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MST-2	mammalian sterile 20-like kinase
NaCl	Natrium-Chlorid
NTB	Nitroblautetrazoliumchlorid
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGF-R	platelet derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd

pH	negativer dekadischer Log der Wasserstoffionen Konzentration
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PT	Phospho-Tyrosin
PTK	Phosphotyrosin Kinase
PTP	Phosphotyrosin Phosphatase
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PTPIP51	Phosphotyrosin Phosphatase interagierendes Protein 51
Raf	rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma proto-onkogen
Rho	member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SMA	smooth-muscle-actin
SSC	Saline Sodium Citrat
STAT	signal transducer and activator of transcription
TC-PTP	T-cell protein tyrosine phosphatase
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TdT	Terminale desoxynucleotidyl Transferase
TNMT	TRIS-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid-Triton-Base
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TUNEL	terminal transferase dUTP nick end labelling
vWF	von Willebrand-Faktor
v-Src	sarcoma viral oncogen homologue

8.2 Publikation

Stenzinger A, Marker D, Koch P, Hoffmann J, Baal N, Steger K, Wimmer M (2009) Protein tyrosine phosphatase interacting protein 51 (PTPIP51) mRNA expression and localization and its in vitro interacting partner protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in human placenta of the first, second, and third trimester. **J Histochem Cytochem** 57:143-153

8.3 Danksagung

Frau PD Dr. Wimmer danke ich für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in ihr Team, sowie für die immerwährende fachliche und menschliche Betreuung meiner Arbeit.

Bei Claudia Tag möchte ich mich für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und ihre Hilfe in allen Belangen bedanken.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, die mir stets bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn David Märker, Herrn Albrecht Stenzinger und Herrn Phillip Koch für die Unterstützung bei der Erstellung der Publikation.

Herrn Thorsten Meyberg und Herrn Martin Großmann danke ich für die Freundschaft und die aufbauenden Gespräche nach so manchen ernüchternden Tagen im Labor.

Anika möchte ich für die immer währende Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld während der Promotionszeit danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir erst mein Studium ermöglicht haben und ohne deren langjährige Unterstützung diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

